

چکیده:

زمینه: P16INK4a یک پروتئین سرکوب کننده تومور است که در مواقع تکثیر غیرطبیعی سلول، بر روی چرخه سلولی نقش مهمی دارد. ارتباط میان افزایش در بیان این پروتئین با سیر سرطان دهانه رحم به طور اختصاصی، این پروتئین را به یکی از بیومارکرهای مورد استفاده در تشخیص سرطان دهانه رحم تبدیل کرده است.

هدف: بسیاری از مطالعات P16INK4a را به عنوان یک بیومارکر تشخیصی جدید و کارآمد معرفی می کنند اما در مطالعات گوناگون گزارشات متناقض نیز مشاهده می شود و همچنین گزارشات از ایران در این زمینه بسیار اندک است. با توجه به رویکرد کیفی غالب مطالعات، بیان و میزان افزایش در بیان ژن P16INK4a با روش کمی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش انجام کار: تعداد ۸۳ نمونه بافتی FFPE (شامل ۲۴ نمونه نرمال، ۳۷ نمونه پیش سرطانی و ۲۲ نمونه سرطانی) از نظر بیان و میزان افزایش در بیان ژن P16INK4a نسب به یک ژن خانه دار (ACTB) با روش relative quantitative Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بیان P16INK4a در ۵۵٪ موارد سرطانی با ۶/۰۱ برابر افزایش بیان، ۴۶٪ لزیون های اسکوآموس داخل اپیتلیالی با ۳/۴۲ برابر افزایش بیان، ۳۳٪ بافت های دارای تغییرات Koilocytic با ۱/۱۲ برابر افزایش بیان و همچنین ۱۲/۵٪ بافت های نرمال مشاهده شد. حساسیت، ویژگی و دقت آزمایش به ترتیب عبارت از: ۵۴/۵، ۸۷/۵، ۷۱/۷ درصد در تشخیص موارد سرطانی، ۴۶/۲، ۸۷/۵ و ۷۲/۹ درصد در تشخیص لزیون های اسکوآموس داخل اپیتلیالی و ۳۳/۳، ۸۷/۵ و ۶۰ درصد در تشخیص بافت های دارای تغییرات Koilocytic بود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد بیان و میزان بیان ژن P16INK4a و همچنین حساسیت و دقت آزمایش با پیش رفت بیماری به سمت سرطان افزایش پیدا کرده و بیشترین میزان بیان در مرحله سرطان مشاهده می گردد بنابراین افزایش بیان پروتئین P16INK4a می تواند به عنوان یک بیومارکر در تشخیص و تعیین روند بیماری در افراد با درجات بالای بدخیمی در دهانه رحم مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: P16INK4a - سرطان دهانه رحم - بیان ژن - Real-Time PCR

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه و بیان مسئله:

سرطان عارضه‌ای است که در اثر تکثیر بی‌رویه سلول‌ها ایجاد می‌شود. برای ایجاد سرطان، یک سیگنال اولیه لازم است که طی آن سلول دچار تغییرات ژنتیکی می‌شود. در سلول‌های سرطانی موتاژن‌های متنوع، ویروس‌های انکوژن و خطاهای همانند سازی، تنظیم چرخه سلولی را برهم می‌زنند. در سال‌های اخیر آلودگی با ویروس‌های سرطان‌زا تقریباً عامل ۲۰ درصد از کل سرطان‌های دنیا در سال می‌باشند.

سرطان دهانه رحم (cervical cancer) یک بیماری قابل پیشگیری و دومین بدخیمی شایع در زنان سراسر جهان می‌باشد. میزان بروز این بیماری بین ۱۵ به ۱۰۰۰۰۰ در اروپا و ۳۳/۵ به ۱۰۰۰۰۰ در آمریکا لاتین متغیر می‌باشد در ایران نیز بعد از سرطان پستان این بدخیمی شایع‌ترین نوع سرطان در زنان ایرانی و یکی از متداول‌ترین علل مرگ و میر زنان می‌باشد.

فاکتورهای متفاوتی از جمله رژیم غذایی، مصرف سیگار، شرکای جنسی متعدد، قرص‌های ضد بارداری، بیماری‌های منتقل شونده از راه جنسی (HIV، کلامیدیا) و پیری می‌تواند با این بیماری مرتبط باشد؛ اما مهمترین عامل، عفونت با High risk human Papillomavirus (HR-HPV) شناخته شده است.

با توجه به اهمیت موضوع و میزان هزینه‌های کلان تحمیلی به سیستم‌های بهداشتی و درمانی کشورها، شناسایی و توسعه روش‌های غربالگری و تشخیص با دقت و صحت بالا امری ضروری به نظر می‌رسد. در حال حاضر روش غربالگری و تشخیص مرسوم در کشور ما اسمیر پاپانیکولا (پاپ اسمیر) می‌باشد اما با توجه به محدودیت‌های روش‌های سیتولوژی و هیستولوژی از جمله عدم حساسیت کافی در یک بررسی و نیاز به بررسی‌های

مکرر و وابستگی بسیار زیاد به مهارت فردی و شرایط نمونه گیری و همچنین در مواردی محدودیت برای تشخیص آدنو کارسینوما، نیاز به گسترش روش های مکمل برای غربالگری دقیق تر و تشخیصی هرچه زودتر برای شناسایی به موقع درجهت مدیریت صحیح بیماران درگیر احساس می شود. امروزه با توجه به پیشرفت سریع و برق آسای تکنولوژی در حیطه پزشکی و تجهیزات آزمایشگاهی تلاش هایی در سال های اخیر برای استفاده از روش های مولکولی با دقت و صحت بسیار بالا در کشورهای پیشرفته به منظور غربالگری هرچه بهتر بیماران صورت گرفته است .

یکی از روش هایی به تازگی و در سال های اخیر توسط محققان این حوزه معرفی و مورد آزمایش قرار گرفته است بررسی بیان ژن سرکوب کننده تومور P16INK4a و یا حضور محصولات پروتئینی آن در بافت دهانه رحم می باشد. رابطه اختصاصی میان سرطان دهانه رحم و افزایش در بیان این ژن، آن را به یک بیومارکر مناسب و در دسترس برای شناسایی سیر نامنظم و تغییرات چرخه سلولی برای آغاز بدخیمی می باشد که می توان با روش های ایمونوهیستوشیمی، Microarray و Real-Time PCR آن را شناسایی کرد. در سالهای اخیر از این پروتئین برای اهداف تشخیصی در نمونه های مربوط به سرطان دهانه رحم در زنان استفاده شده است و توانسته است تکرار پذیری جوابها را افزایش دهد و بنظر می رسد بتواند در تشخیص ضایعات پیش سرطانی و همچنین پیش بینی سیر آنها کمک کننده باشد.

با توجه به کیفی بودن غالب مطالعات و همچنین عدم وجود گزارشات کافی در این زمینه از ایران، در این مطالعه بررسی بیان ژن P16INK4a به عنوان بیومارکر مولکولی در تشخیص سرطان دهانه رحم یا مراحل بدخیمی های قبل از آن در نمونه های بیوپسی پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم و مقایسه نتایج آن با نتایج حاصل از پاتولوژی مورد هدف قرار داده شده است، علاوه بر آن نتایج به دست آمده از این طرح می تواند امکان مقایسه

نتایج به دست آمده از این بیومارکر با سایر بیومارکرهای مولکولی تشخیصی در سرطان دهانه رحم را فراهم آورد..

۱-۲ سرطان:

در طول تکامل طبیعی و در تمام زندگی سیستم های کنترلی ژنتیکی پیچیده ای پیدایش بین پیدایش و مرگ سلول را تنظیم می نمایند. این سیستم های کنترلی در پاسخ به پیام های رشد، پیام های مهار و پیام های مرگ سلولی عمل می کنند. در بسیاری از اعضا و بافت های موجودات زنده، تعادلی میان تجدید سلول و مرگ سلولی برقرار است. در بدن، انواع مختلفی از سلول های بالغ، طول عمر مشخص دارند و با مرگ آنها، سلول های جدید در اثر تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول های بنیادی ایجاد می شوند. تحت شرایط طبیعی، تولید سلول های جدید به گونه ای تنظیم می شود که شمار انواع سلول ها ثابت باقی می ماند. وقتی مکانیسم هایی که سرعت رشد را حفظ می نمایند به خوبی عمل نکنند باعث تقسیم سلولی اضافی و ایجاد سرطان می گردند. نقص تنظیم سلولی، دلیل اکثریت و یا تمام موارد سرطان می باشد (۱).

گاهی تصور می شود سلول های ایجاد شده تنها برای مدت زمانی کوتاه به مکانیسم های کنترلی رشد طبیعی پاسخ می دهند، این سلول ها کلون هایی را بوجود می آورند که شاید به صورت قابل ملاحظه ای از نظر تعداد و اندازه افزایش بیابند و تومور یا نئوپلاسم^۱ را ایجاد کنند توموری که قادر به رشد نامحدود نباشد و قادر نیست به بافت های سالم اطراف خود تهاجم یافته و گسترش پیدا کند، تومور خوش خیم^۲ نامیده می شود. و توموری

¹ Neoplasm

² benign

که بدون حد و مرز به رشد خود ادامه دهد و مهاجم باشد، بدخیم نامیده می شود. واژه ی سرطان به یک تومور بدخیم^۱ گفته می شود. علاوه بر رشد کنترل نشده، تومورهای بدخیم، متاستاز^۲ را نیز نشان می دهند. در این حالت، دسته های کوچکی از سلول های سرطانی از تومور جدا شده و توسط عروق لنفاوی یا خونی به سایر بافت ها منتقل می شوند و در آنجا نیز به تکثیر خود ادامه می دهند. در این صورت، یک تومور اولیه در یک محل می تواند تومور ثانویه را در محل دیگر بوجود آورد(۲).

تومورهای بدخیم یا سرطان ها را می توان برحسب منشأ بافتی که از آن نشأت گرفته اند، طبقه بندی نمود. بیشتر تومورها کارسینوما^۳ می باشند (تومورهایی که از بافت های اندودرمی یا اکتودرمی نظیر پوست یا سلول های اپی تلیال اعضای داخلی و غدد مشتق می شوند). اکثر سرطان های کولون، پستان، پروستات و ریه از نوع کارسینوما هستند. لوسمی و لنفوم، تومورهای بدخیم سلول های خونساز مغز استخوان ها هستند. در لوسمی ها، سلول ها به صورت جدا از هم تکثیر یافته در حالی که در لنفوم ها، رشد تومور به صورت توده ای می باشد. سارکوم^۴ که شیوع کمتری دارد از بافت هایی نظیر استخوان، چربی و غضروف نشأت می گیرد(۳).

۱-۳ چرخه سلولی :

مطالعات گسترده نشانگر رابطه ای دقیق و پیچیده بین چرخه سلولی و سرطان است. اکثر و احتمالاً "عموم سرطان های انسانی رشدی بی رویه دارند. این رشد غیر عادی هم به دلیل آشفتگی و انحراف در مسیرهای

¹ Malignance

² metastasis

³ carcinoma

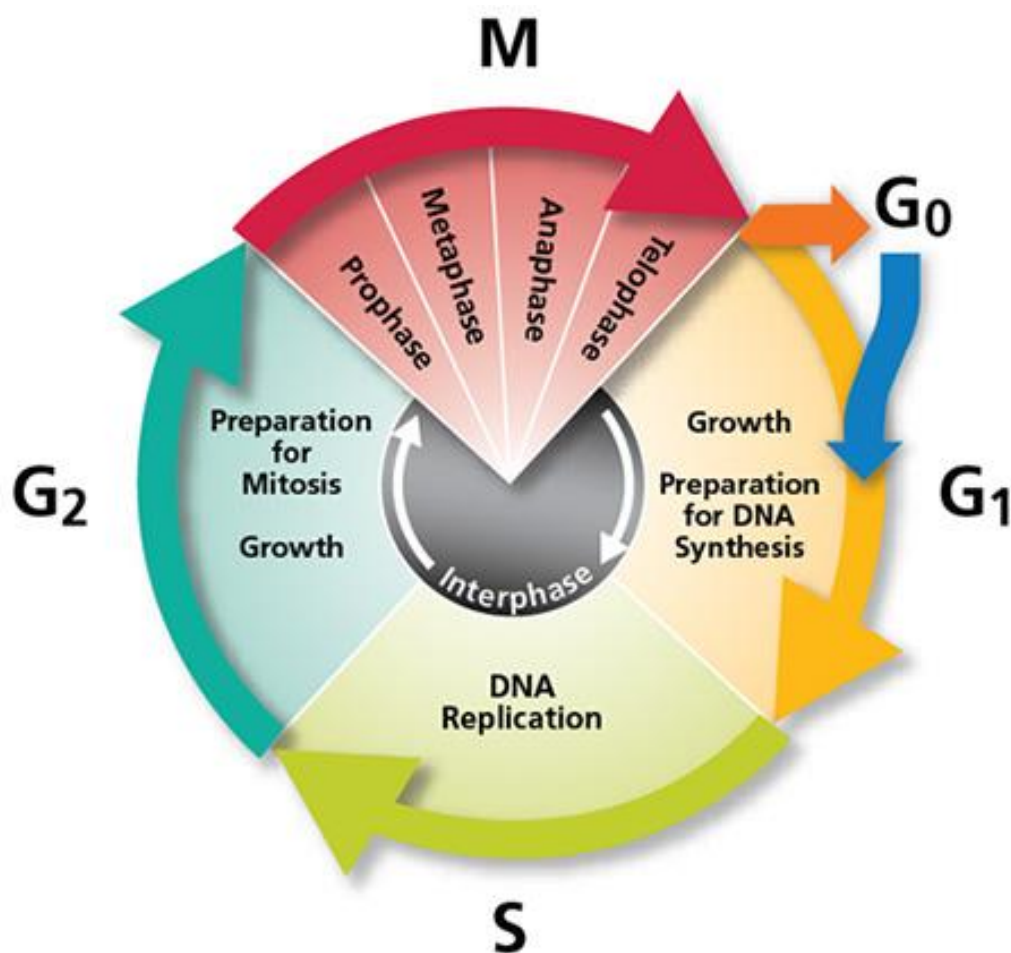
⁴ sarcoma

علامت رسانی در سلول ها و هم به دلیل برهم خوردن نظم چرخه سلولی مشتمل بر اجتماعی از پروتئین های برهم کنش کننده به عنوان مدیریت تصمیم گیر سلول ، از جمله تصمیم گیری برای عبور سلول از چرخه سلولی است و بدیهی است هرگونه اختلال در عملکرد طبیعی دقیق و پیچیده آن ، می تواند در مسیر پیدایش سرطان نقش کلیدی ایفا کند. بنابر این کنترل صحیح چرخه سلولی برای تمام موجودات حیاتی است چرا که همانگونه که اشاره شد رشد و تکثیر خارج از کنترل سلول ها در بدن می تواند منجر به ایجاد سرطان شود. اصطلاح چرخه سلولی به یک سری وقایع پشت سر هم اشاره دارد که طی آن تقسیم سلولی رخ داده و دو سلول دختری مشابه هم از سلول مادر شکل می گیرد که هرکدام دارای کروموزوم های یکسان با سلول مادری می باشند. دو واقعه ی اصلی در چرخه سلولی مراحل S و M می باشد که یک زمان استراحت در بین این دو قرار دارد. مرحله S که در آن کروموزوم مادری دو برابر می شود تا دو کروماتید خواهری یکسان تشکیل شود و مرحله M یا میتوز که کروماتید های خواهری حاصل بین دو سلول دختری تقسیم می شود. به طور کلی چرخه سلولی به چهار فاز اصلی تقسیم می شود. مرحله G1 که در طی آن سلول ها رشد کرده و RNA و پروتئین های مورد نیاز جهت سنتز DNA ساخته می شود. وقتی سلول به اندازه مناسب خود رسید و آمادگی لازم برای تکثیر را کسب کرد با عبور از نقطه ی START وارد مرحله S یا سنتز می شود که سلول در آن کروموزوم هایش را همانند سازی می کند. سپس از طریق فاصله دوم یا مرحله G2 سلول شروع به کامل کردن مرحله میتوز (M) می کند. چرخه سلولی، مهمترین موجودیت برای بقا و سلول است . عوامل و پروتئین های فراوان درنقش های مثبت یا منفی در نقاط و گلوگاه های متعدد، این چرخه را به طور دقیق و هماهنگ ، تنظیم و کنترل می کنند .درواقع، درسلولها، ژنهای متنوعی حضور دارند که پروتئین های لازم برای کنترل چرخه سلول را رمزدهی می کنند(۱).

با آنکه چرخه سلولی در ایستگاههای متعددی کنترل و بازرسی می شود، این تنظیم به ویژه در دو نقطه باشدت و مراقبت خارق العاده ای صورت می گیرد. سلول، در مرحله ی اول قسمت همانند سازی DNA (G1 به S) و در قسمت بعد برای شروع تقسیم میتوز (G2 به M). مراحل گذار، با کنترل ژنتیکی سلول، به عنوان نقاط بازرسی به طور هماهنگ وارد عمل می شوند و موجبات بقاء سلول به حالت طبیعی را فراهم می آورند. به عنوان نمونه، در این نقاط به منظور بقاء سلول، آسیب احتمالی وارده به DNA، در حداکثر توان، تشخیص داده شده و راهکارهای لازم برای رفع آن، یعنی ترمیم تدارک دیده می شود. برنامه های ساعت چرخه سلولی در واقع ردیفی از مراحل و رخداد های به هم پیوسته را با واسطه انواع متنوعی از مولکولها انجام می دهد. در واقع در روند چرخه فرآورده های پروتئینی مربوط به ژن های خاصی در تنظیم دقیق چرخه سلولی نقش های تقویت کنندگی یا مهار کنندگی را برعهده دارند. از میان این مولکولها دو ملکول پلی پپتیدی به نام های سیکلین ها (Cyclins) و پروتئین کینازهای وابسته به سیکلین (Cycline Dependent Protein Kinases) یا به اختصار CDKs در فرآیند آغاز سازی و ورود به مراحل متنوع چرخه سلولی و به عنوان آغازگر های اصلی برای عبور از یک مرحله به مرحله دیگر چرخه و در ارتباط با یکدیگر از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۱).

طور نمونه، در مرحله G1 سیکلین های نوع D به پروتئین کینازهای وابسته به سیکلین های نوع ۴ و ۶ به متصل شده و در نتیجه آن، این مجموعه بر روی مولکول قدرتمند بازدارنده رشد به نام پروتئین RB (رتینوبلاستوما) عمل می کند. این عمل، موجبات رهاسازی اثر ترمز کنندگی این پروتئین را فراهم می آورد و در نتیجه آن، سلول قادر می شود تا وارد مراحل نهایی G1 و سپس S گردد. پروتئین های اتصال که به نام بازدارنده های پروتئین کینازهای وابسته به سیکلین (Cycline Dependent Protein Kinase inhibitors) خوانده می شوند، چرخه سلولی را در نقطه بازرسی متوقف می کنند. اگرچه، به مجرد دریافت چراغ سبز از مکانیسم های کنترل

کننده ، که مفهوم آن آمادگی کامل سلول برای ورود به مرحله بعدی چرخه است، این منع برداشته می شود .
 فرآیند کنترل منفی یا بازدارندگی فعالیت CDK که در نقاط بازرسی سلول در مراحل G1 و G2 صورت می گیرد
 به عنوان اهرم ترمز عمل می کند .به طور مثال در زمانی که ملکول DNA در خلال مرحله G1 توسط عاملی
 مانند پرتوایکس آسیب می بیند ، شرایطی فراهم می آید که طی آن درستی همانند سازی DNA و دیگر فرآیندهای
 اصلی سلول تضمین گردد(۱).



تصویر ۱-۱ تصویر شماتیک از چرخه سلولی و مراحل آن

۴-۱ فاکتور های محیطی و ژنتیکی در سرطان :

هومئوستازی^۱ در بافت طبیعی ، توسط یک روند تنظیم شده تکثیر سلولی که همواره با مرگ سلولی در تعادل است حفظ می شود .در صورت عدم تعادل، چه در مرحله تکثیر سلولی و چه در مرحله مرگ سلولی، یک حالت سرطانی برای سلول ها به وجود می آید .چرخه سلولی به خودی خود توسط فاکتورهای رشد تنظیم می شود و این فاکتورهای رشد باعث هماهنگ بودن تقسیم هر سلول می شوند. زمانی که کنترل تنظیم سلولی مهار شود، سلول های تغییر یافته رشد کرده و تکثیر خواهند شد و نهایتاً می توانند در سراسر بدن پخش شوند و در عملکرد بافت ها و ارگان ها مداخله کنند . طی ایجاد سرطان ، ژن های تنظیم کننده آسیب دیده و منجر به تولید سلول های بیش تری می شوند .پس می توان گفت سرطان نتیجه تغییرات عمده در ژن های تنظیم کننده ای می باشد که تکثیر و تمایز و بقای سلولی را کنترل می کنند ، عقیده بر این است که توسعه سرطان ، شامل یک سری میان کنش پیچیده بین چندین فاکتور محیطی و فاکتور ژنتیکی می باشد .فاکتورهای محیطی که فاکتورهای خارجی نامیده می شوند، شامل عوامل فیزیکی (از جمله تشعشعات مثل اشعه X و اشعه UV) و عوامل شیمیایی (مثل موتاژن ها^۲ و کارسینوژن ها و عوامل عفونی مثل باکتری ها و ویروس ها می باشند(۱).

همانطور که اشاره شد فاکتور دوم در شکل گیری سرطان فاکتور های ژنتیکی می باشند. انکوژن ها و ژن های سرکوبگر تومور، نقش مهمی در این فرآیند ایفا می کنند زیرا این ژنها هستند که تکثیر یا مرگ سلولی را تنظیم می کنند. ژن های مرتبط با سرطان را بر اساس عملکرد آنها می توان در ۳ دسته بندی قرار داد.

¹ homeostasis

² mutagen

۱-۴-۱ ژنهای موثر در القای تکثیر سلولی:

یک دسته از انکوژن ها پروتئین هایی را کد می کنند که موجب القای تکثیر سلولی می شوند. برخی از این پروتئین ها به عنوان عوامل رشد یا پذیرنده های آنها عمل می کنند. در سلول های طبیعی، عوامل رشد و پذیرنده های آنها به طور دقیق تنظیم می شوند. معمولاً یکی از جمعیت های سلولی، فاکتور رشدی را ترشح می کنند که با تأثیر بر روی جمعیت های سلولی حامل پذیرنده این فاکتور موجب تحریک تکثیر جمعیت سلولی دیگری می شوند. عرضه نامناسب هریک از عوامل رشد و یا پذیرنده آنها ممکن است منجر به تکثیر کنترل نشده گردد. انکوژن های دیگر، محصولاتی را کد می کنند که در مسیر انتقال پیام عملکرد داشته و یا به عنوان عوامل نسخه برداری کار کرد دارند. به عنوان مثال انکوژن های SRC و AB1 تیروزین کینازها^۱ را کد می کنند و انکوژن ras یک پروتئین متصل شونده به GTP را کد میکند. محصولات این ژن ها به عنوان پیام رسان عمل می کنند. فعالیت بیش از حد هریک از این انکوژن ها ممکن است منجر به تکثیر تنظیم نشده گردد(۲).

۱-۴-۲ ژن های موثر در مهار تکثیر سلولی

دسته دوم ژن های مرتبط با سرطان، ژن های سرکوبگر تومور یا آنتی انکوژن ها می باشند که پروتئین هایی را کد می کنند که موجب مهار تکثیر بیش از حد سلول ها می شوند. غیر فعال شدن این ژن ها منجر به از کنترل خارج شدن تکثیر سلولی یا به عبارت دیگر تکثیر تنظیم نشده می گردد. ژن شاخص این دسته Rb (ژن

¹ tyrosine kinase

رتینوبلاستوما) می باشد اما می توان گفت احتمالاً بیشترین ناهنجاری ژنتیکی در سرطان های انسانی مرتبط با جهش در ژن سرکوبگر تومور P53 می باشد(۲).

۱-۴-۳ تنظیم مرگ برنامه ریزی شده سلولی

دسته سوم ژن های مرتبط با سرطان، مرگ برنامه ریزی شده سلول را تنظیم می کنند. این ژن ها پروتئین های را کد می کنند که موجب تحریک یا توقف آپوپتوز^۱ می شوند. از جمله این انکوژن ها، BCL2 می باشد. این انکوژن در ارتباط با لنفوم فولیکولی سلول B کشف شد و با کشف آن مشخص گردید در تنظیم بقای سلولی در طول خونسازی و همچنین بقای سلول های B و T گزینش شده در طی بلوغ، نقش مهمی بر عهده دارد(۲).

۱-۵ سرطان و عوامل عفونی :

بررسی رابطه بین عوامل عفونی و سرطان از زمان اعلام نقش این عوامل در بیماری های مزمن مانند نقش مایکوباکتریوم در بیماری سل آغاز شد. از آن زمان دانشمندان در سراسر جهان سعی در شناسایی ویروس ها ، میکروب ها و انگل هایی کردند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم می توانند در ایجاد یا پیشرفت سرطان نقش داشته باشند که البته بسیاری از این تحقیقات موفقیت آمیز نیز بوده است مانند کشف نقش باکتری هلیکوباکتر پیلوری در سرطان معده و نقش ویروس^۲ HPV در سرطان دهانه رحم. در ابتدای قرن نوزدهم و ابتدای قرن

¹ apoptosis

² Human papilloma virus

بیستم اوج تلاش ها برای شناسایی این عوامل موثر در سرطان بود. از جمله تلاش ها بررسی رابطه بین کرم های کبدی و سرطان های آن ناحیه و همچنین عفونت شistosoma^۱ و سرطان مثانه بوده است. روند شکست ها در این روند از دهه ۶۰ قرن گذشته میلادی تغییر کرد، از آنجا که دانشمندان متوجه شدند در کشت های سلول های سرطانی خاصی (بعد ها : لنفوم بورکیت) ذرات خاصی شبیه ویروس های هرپس وجود دارند. بعد ها با اثبات حضور DNA و انجام آزمایشان ایمونولوژی و آنتی بادی مشخص شد احتمالاً عامل این نوع سرطان میتواند EBV^۲ (اپشتین بار ویروس) باشد. با توجه به اینکه در یک بافت سرطانی ممکن است عوامل مختلف عفونی از روش های مختلف قابل ره گیری و شناسایی یا تکثیر باشند، بنابر این نمی توان گفت الزاماً این عوامل باعث ایجاد آن نوع از سرطان خاص در آن بافت شده اند. برای اعلام یک میکروارگانیزم به عنوان یک عامل موثر در ایجاد یا پیشرفت سرطان باید ملاحظات خاصی در نظر گرفته شود (۴, ۵).

۱-۵-۱ ملاحظات اپیدمیولوژیکی:

باید شیوع ویروس و شیوع تومور خاص در یک منطقه با هم هم خوانی داشته باشند و شیوع ویروس مورد نظر در افراد مبتلا به آن تومور یا سرطان به صورت معنی داری بالاتر از افراد سالم باشد. اثبات شود که عفونت ویروسی قبل از آغاز سرطان رخ داده است و همچنین با واکسیناسیون میتوان از شیوع بیشتر آن سرطان جلوگیری نمود (۵).

۱-۵-۲ ملاحظات میکروب شناسی:

^۱ schistosoma

^۲ epstein barr virus

از جمله اینکه ویروس یا باکتری مورد نظر باید توانایی ترانسفرم کردن کشت سلولی را داشته باشد. ژنوم ارگانسیم باید در سلول های سرطانی حضور داشته باشد ولی در سلول های سالم یافت نشود. همچنین با القای پاسخ ایمنی پیش از ورود ویروس یا عامل عفونی مورد نظر باید بتوان جلوی عملکرد آن عامل که در واقع ایجاد تومور است را گرفت. شاید بتوان اصلی ترین عامل عفونی سرطان را ویروس ها دانست، ویروس ها به طور کلی به دو صورت توانایی سرطان زایی خود را بروز می دهند : ۱- سرطان زایی مستقیم ۲- سرطان زایی غیر مستقیم

۱-۲-۵-۱ سرطان زایی مستقیم:

بعضی از ویروس ها می توانند با تولید محصولات پروتئینی خود یا ادغام ژنوم خود در ژنوم سلول آلوده میزبان سبب ترانسفرم شدن سلول ها بشوند. بطور مثال در مورد ویروس HPV اگر دو ژن E6 و E7 این ویروس بیان نشوند سلول های دهانه رحم ترانسفرم نمی شوند.^۳ دسته از ویروس ها در این خانواده قرار می گیرند شامل:

۱ -دسته ای از ویروس ها که با خود انکوژن حمل میکنند مثل پاپیلوما ویروس ها

۱- دسته ای از ویروس ها که انکو پروتئین های سلولی را کسب کرده اند مثل ویروس روس سارکوما^۱

۳- دسته ای از ویروس ها که بعد از داخل شدن با الحاق به نقاط خاصی از کروموزوم ها سبب بیان بیش از

حد انکو پروتئین ها می شوند مثل ویروس MMTV.^۲

۱-۲-۵-۲ سرطان زایی غیر مستقیم:

¹ Rous sarcoma virus

² Mouse mammary tumor virus

دسته ای از ویروس ها از جمله ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) از راه های دیگری از جمله با سرکوب سیستم ایمنی بدن شرایط را به گونه ای برای سایر عوامل آماده می کند که می توانند اثرات مخرب خود را به جا بگذارند. برای نمونه ویروس HIV با سرکوب سیستم ایمنی به گونه ای شرایط را مهیا می کند که ویروس HHV8¹ میتواند ایجاد سارکومای کاپوزی کند. دسته دیگری از این خانواده با جلوگیری از مرگ سلولی یا تداخل در چرخه سلولی و همچنین ایجاد تداخلاتی در ژن های سرکوب کننده تومور و خاموش کردن آنها باعث ایجاد سلول هایی نامیرا با پتانسیل سرطان زایی می شوند. همچنین گاهی عفونت هایی که برای مدت بسیار طولانی مزمن می شوند و با پاسخ دائمی سیستم ایمنی روبرو هستند با مرور زمان به علت وجود رادیکال های آزاد ناشی از پاسخ سلول های ایمنی به عفونت، در خطر تبدیل شدن به سرطان هستند. رادیکال های آزاد اکسیژن توانایی بالقوه ای برای آسیب زدن به DNA دارند و از طرفی بعد از هر آسیب یک فاز تکثیری ترمیمی پدیدار می شود که همراهی این دو باهم خطر نامیرایی سلول های درگیر را افزایش می دهد(۵).

۱-۵-۳ انواع مختلف ویروس های تولید کننده تومور

در طبقه بندی دیگری ویروس های تولید کننده تومور به دو دسته ی DNA ویروس ها و RNA ویروس های تولید کننده تومور طبقه می شوند. ویروس های DNA دار تولید کننده تومور در گروه های پاپیلوما، آدنو، هرپس، هپادنا و پاکس قرار می گیرند که غالبا قادر به تولید انکوپروتیین های ویروسی بوده که در تکثیر ویروس اهمیت دارد اما همچنان مسیر های کنترل کننده رشد سلولی را تحت تاثیر قرار می دهند. RNA ویروس های تولید کننده تومور بر اساس تولید تومور به دو نوع تقسیم می شوند:

¹ Human herpes virus A

۱- ویروس هایی که خاصیت انکوژنی نیرومندی دارند (تغییر دهنده مستقیم) . این ویروس ها یک انکوژن

با منشاء سلولی را همراه خود دارند.

۲- ویروس هایی که خاصیت انکوژنی ضعیفی دارند (تغییر دهنده آهسته) . این ویروس ها انکوژن ندارند

و لوکمی را بعد از مدت طولانی و با مکانیسم های غیر مستقیم ایجاد می کنند(۶).

۱-۶ ویروس های سرطان زا در انسان:

سرطان های ناشی از ویروس های سرطان زا حدود ۱۵-۱۰ درصد سرطان های دنیا و حدود ۱/۳ میلیون سرطان

در سال را شامل می شوند. تا به امروز شش ویروس انسانی شامل؛ ایشیتاین -بار ، ویروس هپاتیت B ، ویروس

هپاتیت C ، پاپیلوما ویروس، هرپس ویروس انسانی ۸، ویروس لنفوتروپیک T انسانی^۱ ، توسط سازمان بین

المللی تحقیق روی سرطان ها^۲، در طبقه بندی عوامل سرطان زا قرار گرفته اند، ویروس نقص ایمنی انسان نیز

جزء عوامل سرطان زا مطرح شده؛ البته همانطور که پیش تر مطرح شد این ویروس بیشتر با مهار سیستم ایمنی،

زمینه را برای ایجاد بدخیمی و تومور توسط عوامل دیگر فراهم می کند(۷).

¹ HTLV

² IARC

جدول ۱-۱ ویروس های مرتبط با سرطان در انسان

ویروس	سال کشف	بیماری مرتبط با عفونت اولیه	سرطان شناخته شده انسانی مرتبط با ویروس	سرطان انسانی مشکوک به دخالت ویروس در آن
ویروس اِشتاین بار (EBV)	۱۹۶۵	بیماری بدون عوارض، مونوکلئوز عفونی	لنفوم بورکیت، کارسینومای نازوفارنکس، لنفومای هوچکین، لنفومای غیر هوچکین مرتبط با مهپار ایمنی	کارسینومای معده (گوارشی)، کارسینومای شبه لنفوبی تلیوما، لیومپو سارکوم، لنفوم سلول های NK/T، کارسینومای مجاری صفراوی، لنفومای غیر هوچکین
ویروس هپاتیت B (HBV)	۱۹۶۸-۱۹۶۷	بدون علامت، هپاتیت حاد، عفونت مزمن و طولانی کبد	کارسینومای هپاتوسلولار	کارسینومای مجاری صفراوی، لنفومای غیر هوچکین
ویروس لنفوتروپیک T انسانی نوع ۱ (HTLV-1)	۱۹۸۰	۲ درصد ابتلا به بیماری پیشرونده تخریب میلین نوروں حرکتی بالایی (به فلج اسپاسمی گرمسیری مرتبط با HTLV-1)	لوکمی و لنفومای سلول T بزرگسالان	ناشناخته
پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) (تیپ هایی با خطر بالا)	۱۹۸۳	ناشناخته	کارسینومای سرویکس، vagina, vulva, anus, penis، حفره دهانی و اوروفارنکس و تونسیلیت	سرطان حنجره و بعضی سرطان های سر و گردن
ویروس هپاتیت C (HCV)	۱۹۸۹	بدون علامت، هپاتیت حاد	کارسینومای هپاتوسلولار، لنفومای غیر هوچکین	کارسینومای مجاری صفراوی
هرپس ویروس مرتبط با سارکوم کاپوسی (KSHV)	۱۹۹۴	ناشناخته	کارسینومای هپاتوسلولار، لنفومای غیر هوچکین	بیماری چند کانونی کاستلن
پولیوما ویروس سلول مرکل (MCPyV)	۲۰۰۸	ناشناخته	ناشناخته	کارسینومای سلول مرکل

مطالعه این که یک ویروس چگونه سیستم تنظیم سلولی و درون سلولی و حتی مکانیسم های سیگنالینگ^۱ بین سلولی را برای موفقیت در همانند سازی خود به کار می گیرد، یک نگرش جدید برای برخورد و شناخت سرطان ایجاد کرده است امروزه، بسیاری از دانشمندان بر این باورند که مطالعه سرطان، بدون پرداختن و در نظر گرفتن ویروس های تومورزا ناقص می باشد. بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیکی و مولکولی پیش بینی می شود که در طی چندین دهه آینده، با شناخت ماهیت ویروس ها، ابزارهای مفیدتری برای ممانعت و درمان سرطان های مرتبط با آن ها در اختیار قرار گیرد (۷).

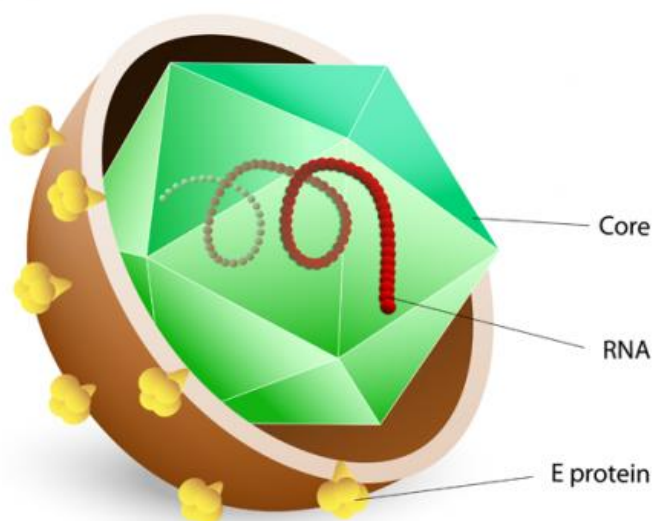
از این رو با شناسایی ویروس های سرطان زا و مکانیسم سرطان زایی آن ها می توان از ظهور و انتشار این ویروس ها جلوگیری کرده و به پیدا کردن راه های جدید و واکسن های ایمن و مؤثرتر علیه سرطان و ویروس

¹ Cell signaling

های مرتبط امیدوار بود. در نوشتار حاضر تلاش شده است تا آخرین یافته های موجود مبنی بر نقش ویروس های ذکر شده در پاتوژنز^۱ سرطان های مرتبط مورد بررسی قرار گیرد (۵, ۸).

۱-۶-۱ ویروس هپاتیت C^۲:

ویروس هپاتیت C یک ویروس RNA دار بوده و متعلق به خانواده فلاوی ویریده^۳ می باشد. ژنوم این ویروس دارای اندازه ۹/۶ کیلو باز است و از یک تک زنجیره RNA با پلاریته مثبت تشکیل شده. ویروس هپاتیت C قادر به ادغام ژنوم خود در ژنوم میزبان نیست با این حال، پروتئین های این ویروس، با پروتئین های مختلف میزبان میان کنش کرده و با القاء پاسخ های میزبانی به طور بالقوه در ترانسفورماسیون بدخیم سلول ها شرکت می کند (۹).



تصویر ۱-۲ تصویر شماتیک ویروس هپاتیت C و اجزای تشکیل دهنده آن

¹ pathogenesis

² hepatitis

³ flaviviridae

کارسینومای هپاتوسلولار معمولاً به عنوان یک پیامد نهایی از پیشرفت متوالی بیماری های فیروز مزمن کبدی مطرح بوده و تنها بعد از برقراری سیروز کبدی در افراد آلوده به ویروس هپاتیت C رخ می دهد. کارسینومای هپاتوسلولار، یک تومور به شدت هتروژن^۱ است. هپاتوکارسینوژنز^۲، فرایندی است که در چند مرحله، باعث بعضی از تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی، فعال شدن انکوژن های سلولی، غیرفعال شدن ژن های مهارکننده تومور و اختلال در تنظیم مسیر سیگنال های انتقالی می شود (۷).

مشخص شده است که عفونت هپاتیت C خطر ابتلا به کارسینومای هپاتوسلولار را با تقویت التهاب و فیروز کبد که در نهایت منجر به سیروز کبدی می شود، افزایش می دهد. عوامل دیگری از قبیل؛ مصرف الکل، دیابت و چاقی گزارش شده اند که خطر پیشرفت به سمت کارسینومای هپاتوسلولار را در حدود ۲ تا ۴ برابر افزایش می دهند که این امر، نشان دهنده تأثیر قوی سبک زندگی بر روی فرایند هپاتوکارسینوژنز می باشد. در واقع، هم فاکتورهای ویروسی و هم فاکتورهای میزبانی در یک مسیر پیچیده بر روی فرایند هپاتوکارسینوژنز اثر می گذارند (۵).

در بیماران مبتلا به سیروز آلوده به ویروس هپاتیت C پیشرفت سالانه به سمت HCC^۳ حدود ۱ تا ۷ درصد است. وقوع HCC مرتبط با هپاتیت C به افزایش خود ادامه داده و و پیش بینی می شود که در دو دهه بعدی، بالا باقی بماند. اگر چه شواهد اپیدمیولوژیکی، ارتباط نزدیکی را بین عفونت هپاتیت C و کارسینومای هپاتوسلولار نشان می دهند اما شیوع عفونت هپاتیت C در بیماران مبتلا به کارسینومای هپاتوسلولار به طور قابل توجهی بین نواحی جغرافیایی متفاوت، متغیر می باشد (۸).

¹ heterogen

² hepatocarcinogenesis

³ hepatic cell carcinoma

در ژنوم هپاتیت C نواحی غیر ترجمه شونده ای وجود دارد که در این نواحی، عوامل کنترلی مورد نیاز برای ترجمه و همانندسازی ویروس وجود دارد. در اثر ترجمه، یک پلی پروتئین ساخته می شود که ۳۰۱۰ یا ۳۰۱۱ آمینواسید داشته و توسط پروتئینهای میزبانی و ویروسی به سه پروتئین ساختمانی E1 و E2 و Core و همچنین هفت پروتئین غیر ساختمانی ، ، P7، NS2، NS3، NS4B، NS4A، NS5A، NS5B^۱ و NS5B برش می خورد از آن جایی که ویروس هپاتیت C یک ویروس RNA دار است که قادر به رونوشت برداری معکوس نمی باشد؛ بنابراین نمی تواند ژنوم خود را به داخل ژنوم میزبان ادغام کند. در عوض، پروتئین های ویروسی و پاسخ های میزبانی علیه این پروتئین ها، به طور وسیعی در فرایند سرطان زایی ویروس شرکت می کنند(۴).

نقش پروتئین های ویروس هپاتیت C:

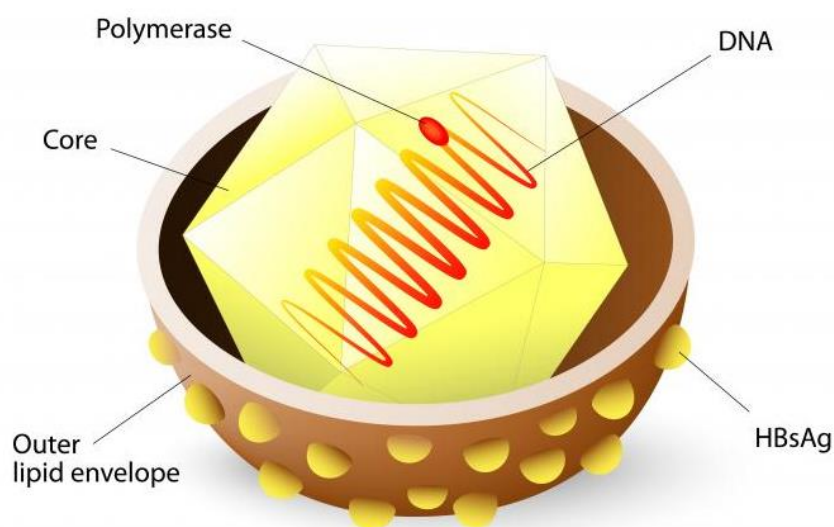
پروتئین Core ویروس ، به چندین پروتئین مهارکننده تومور مانند P53، Rb و P73 متصل می شود. هم چنین، ممکن است پروتئین Core رشد و تکثیر سلول های میزبانی را از طریق فعال سازی مسیرهای سیگنالینگ مانند TGF- β و Wnt/ β -catenin، Raf/MAPK تحت تاثیر قرار دهد. مشخص شده است که این مسیرها در کارسینومای هپاتوسلولار فعال می شوند. پروتئین NS3 ویروس هپاتیت C ممکن است در مراحل اولیه، اثرات هپاتوکارسینوژنز خود را بر روی سلول های میزبانی اعمال کند. این پروتئین ویروسی از فعالیت پروموتور P21 ممانعت کرده و از این لحاظ با پروتئین Core به طور هم افزایی همکاری می کند. هم چنین، پروتئین NS3 از عملکرد مولکول P53 نیز ممانعت می کند. پروتئین NS5A برای همانندسازی ژنوم ویروس هپاتیت C ضروری می باشد و اساساً در سیتوپلاسم سلول های آلوده و در ارتباط با شبکه اندوپلاسمیک قرار گرفته

¹ Non structural

است. پروتئین NS5A در تعداد زیادی از عملکردهای سلولی شامل آپوپتوز، رونویسی، ترانسفورماسیون و تولید ROS^۱ درگیر می باشد. مشخص شده است که این پروتئین عنوان فعال کننده رونویسی برای بسیاری از ژن های هدف مانند P53 و پروتئین متصل شونده به TATA(TBP) عمل می نماید. هم چنین، پروتئین NS5A ممکن است از طریق میان کشش با مسیرهایی مانند Bcl ، TOR ، Wnt/ β -catenin ، PI3-K ، سیگنال های تکثیری سلول را فعال کرده و از آپوپتوز جلوگیری نماید(۴).

۱-۶-۲ ویروس هپاتیت B :

ویروس هپاتیت B کوچک ترین DNA ویروس آلوده کننده انسانی بوده و از خانواده هپادناویریده^۲ می باشد. ارتباط ویروس هپاتیت B با سرطان اولیه کبد، بر شواهد قوی اپیدمیولوژیکی استوار است(۹).



تصویر ۱-۳ تصویر شماتیک ویروس هپاتیت B و اجزای تشکیل دهنده آن

¹ Reactive oxygen species

² hepadenaviridae

سرطان کبد مرتبط با هپاتیت B مزمن به عنوان یک مشکل اصلی بهداشتی محسوب می شود. سرطان کبد به طور واضحی بیشتر در نواحی اندمیک از لحاظ ویروس هپاتیت B رخ می دهد؛ میزان ناقلین مزمن هپاتیت B در بیماران مبتلا به سرطان کبد در جمعیت ها بیشتر بوده و خطر پیشرفت تومورهای کبدی به طور قابل توجهی در ناقلین هپاتیت B افزایش نشان می دهد، اگر چه این دلایل منجر به این شده است که HBV را در بین ویروس های تومورزای انسانی طبقه بندی می کنند، اما این ویروس توانایی ترانسفورماسیون مستقیم را نداشته و ممکن است از طریق مکانیسم های غیرمستقیم در سرطان زایی عمل نماید(۸).

التهاب کبدی ایجاد شده توسط پاسخ های ایمنی میزبان، نقش اصلی را در فرایند سرطان زایی ویروس هپاتیت B بازی می کند. مکانیسم های اختصاصی تری که ناپایداری ژنومی را آغاز می کنند، نیز شناسایی شده اند که شامل ادغام توالی های ویروسی به داخل DNA ژنوم میزبان و بیان طولانی مدت پروتئین ترانس اکتیواتور X^۱ و اشکال تغییر یافته پروتئین های سطحی می باشد. ناپایداری ژنتیکی، یک نقش حیاتی را در شروع و پیشرفت سرطان بازی می کند. به عنوان مثال، ادغام توالی های DNA ویروس هپاتیت B در ژنوم میزبان در مراحل اولیه عفونت حاد رخ می دهد و چندین ادغام نیز در بافت های مبتلا به هپاتیت مزمن ردیابی شده است. به طور قابل توجهی در ۸۰ درصد از موارد کارسینومای هپاتوسلولار مرتبط با ویروس هپاتیت B توالی های DNA ویروس هپاتیت B ادغام شده دیده شده است. این توالی ها به صورت قطعات ناقص بوده و نمی توانند به عنوان الگو برای همانندسازی ویروسی به کار روند. مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین X ویروس هپاتیت B با فرایند کنترل طبیعی پیشرفت چرخه سلولی مداخله کرده و از طریق توانایی اتصال به الگوهای مختلف سلولی، رونویسی و آبشارهای پیام دهی متنوعی را فعال می کند(۷).

¹ x trans activator protein

نقش پروتئین X ویروس هپاتیت B: پروتئین X ویروس هپاتیت B، یک پروتئین ۱۵۴ آمینواسیدی کد شده

توسط ORF^۱ به شدت محافظت شده X ژنوم هپادناویروسی پستانداران می باشد. مشخص شده است که سطح بیان پروتئین X، در سلول های کبدی آلوده با HBV در سیتوپلاسم بالا بوده ولی در هسته پایین می باشد، مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که پروتئین X از طریق افزایش تولید گونه های واکنش گر اکسیژنی (ROS)، فعال سازی کاسپاز^۲، حذف پتانسیل غشای میتوکندری و آزادسازی سیتوکروم C می تواند در سلول های طبیعی بدن آپوپتوز القاء کند، از طرفی دیگر مشخص شده است، که پروتئین X می تواند از آپوپتوز القاء شده توسط TGF- β ^۳ و TNF^۴، Fas، P53 در سلول های سرطانی ممانعت نماید. علاوه بر این، تغییرات اپی ژنتیکی ای شناخته شده اند که در کارسینومای هپاتوسلولار القاء شده توسط ویروس هپاتیت B شرکت می کنند پروتئین X می تواند هایپر متیلاسیون DNA را در ژن های میزبانی مرتبط با مهار تومور و هیپومتیلاسیون DNA را در ژن های مرتبط با پیشرفت تومور با تنظیم DNA متیل ترانسفرازها^۵ القاء کند. تغییرات هیستونی به عنوان نتیجه ای از میان کنش بین پروتئین X با هیستون استیل ترانسفرازها و هیستون متیل ترانسفرازهای مشخص، اغلب به تقویت و پیشرفت کارسینومای هپاتوسلولار کمک می نماید (۴، ۸).

نقش آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B^۶ (HBsAg) تجمع HBsAg در شبکه اندوپلاسمیک، باعث استرس

شبکه اندوپلاسمیک و سپس، استرس اکسیداتیو می شود و این امر به نوبه خود منجر به ایجاد آسیب در DNA و

¹ Open reading frame

² Kaspase Δ

³ Tomur groeth factor

⁴ Tomur necrosis factor

⁵ DNA methyl tranferase

⁶ Surface antigen

تغییرات در چندین مسیر سیگنالی می گردد که این مسیرها با تکثیر سلولی، تهاجم، بقای سلول و آپوپتوز مرتبط هستند. به طور مشابهی، موتانت های Pre-s₂ می توانند در شبکه آندوپلاسمی تجمع یابند و منجر به استرس شبکه آندوپلاسمی و افزایش در سیکلین A سیتوپلاسمی، و افزایش توانایی تکثیری هپاتوسیت ها شوند؛ افزایش سیکلین A سیتوپلاسمیک ممکن است باعث مضاعف شدن سانتروزوم ها شود که این فرایند در ناپایداری کروموزومی هپاتوکارسینومز مرتبط با HBV نقش بازی می کند. مکانیسم های دیگری نیز در مورد نقش HBsAg در پیشرفت کارسینومای هپاتوسلولار مطرح شده است. به عنوان مثال HBsAg می تواند به زنجیره کوتاه انوئیل کوآنزیم A هیدراتاز^۱ (ECHS 1) متصل شود. در مطالعات in vitro در سلول های HePG 2 نشان داده شده است که وجود هم زمان HBsAg و ECHS^۱ می توانند مکان یابی ECHS¹ را در میتوکندری تحت تاثیر قرار داده و با کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، آپوپتوز سلولی را القاء نماید (۵، ۹).

۱-۶-۳ ویروس اپشتاین-بار (EBV)

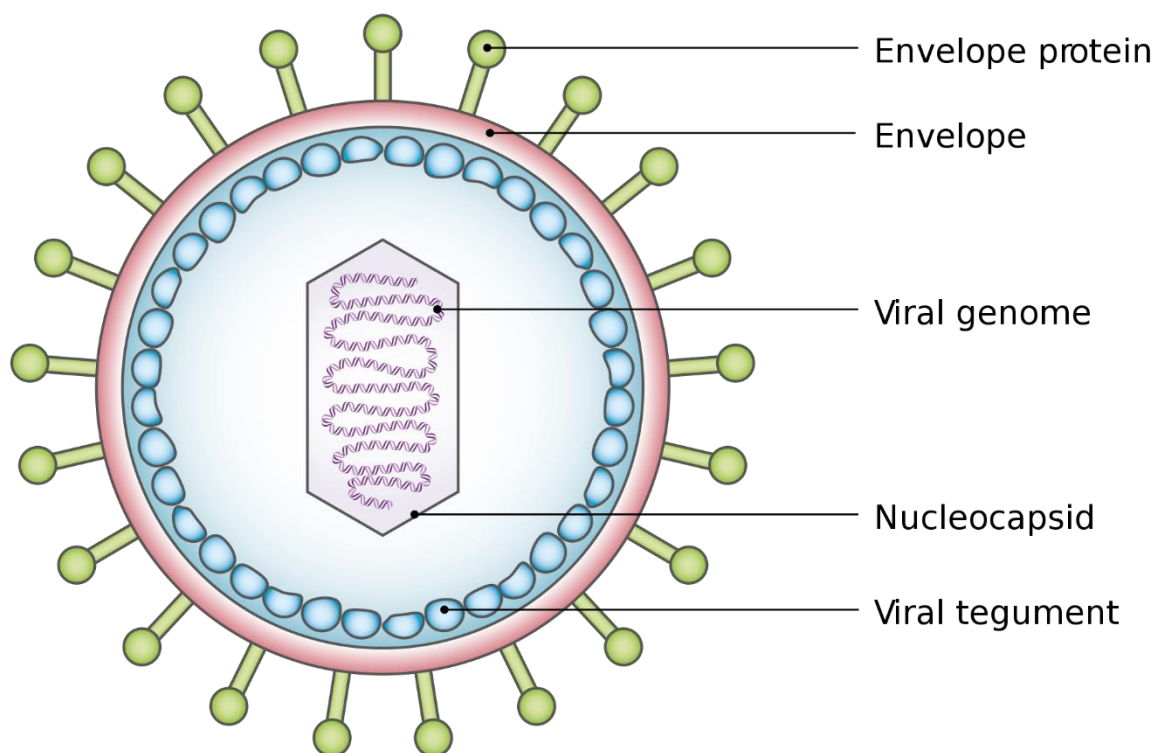
ویروس اپشتاین-بار اولین ویروس انسانی می باشد که مستقیماً در کارسینومز به آن اشاره شده است. این ویروس که هرپس ویروس انسانی ۴ (HHV-4) نیز نامیده می شود، عضوی از خانواده هرپس-ویریده می باشد و توسط مایکل اپشتاین^۲ و یونر بار^۳ در سال ۱۹۶۴ در طی تحقیقات آن ها بر روی لنفوم بورکیت کشف شد. از زمان کشف آن، ویروس اپشتاین-بار در انواع دیگری از تومورهای مختلف نیز یافت شده است. ویریون

¹ enoyl coa hydratase

² Michael epstein

³ Yvonne bar

های EBV مانند اعضای دیگر خانواده هرپس ویریده دارای ژنوم DNA خطی و دو زنجیره ای هستند. این ژنوم تقریباً دارای ۱۰۰ ژن کدکننده بوده و توسط یک کپسید پروتئینی احاطه شده است. یک تگومنت پروتئینی بین کپسید و پوشش ویروس قرار گرفته است. ویریون های ویروس بالغ در حدود ۱۸۰ نانومتر قطر دارند. اِپِشتائین-بار بیش از ۹۰ درصد از جمعیت بالغ جهان را آلوده می کند؛ عفونت معمولاً در اوایل کودکی رخ می دهد (۴).



تصویر ۱-۴ تصویر شماتیک ویروس EBV به همراه اجزای تشکیل دهنده آن

عفونت های ویروس اپشتاین-بار در کشورهای در حال توسعه و در جمعیت هایی با شرایط اقتصادی و اجتماعی نامناسب، بیشترین شیوع را دارد. متوسط شیوع سرمی در کودکان تقریباً ۵۰ درصد بوده و در بالغین به ۹۰ تا ۹۹ درصد می رسد. دو سویه اصلی از ویروس اپشتاین-بار (تپ ۱ و ۲) وجود دارد که در سازمان یابی ژن کدکننده آنتی ژن هسته ای (EBNA) با هم متفاوت می باشند. هر دو تپ در سراسر جهان یافت شده اند، با این حال، تپ ۱ در بعضی از نواحی شایع تر است. ویروس توسط بزاق یا انتشار از طریق تماس دهانی نزدیک به افراد سالم منتقل می شود؛ انتقال از طریق انتقال خون اثبات شده است، مشخص شده است که در میزبانان با نقص سیستم ایمنی، میان کنش بین همانندسازی ویروس اپشتاین-بار، نهفتگی و کنترل ایمنی می تواند مختل شده و تکثیر طولانی مدت لنفوسیت های آلوده با ویروس و ترانسفورماسیون بدخیم آن ها را تحریک نماید (۹).

ویروس اپشتاین-بار می تواند هم سلول های B و هم سلول های اپی تلیال را آلوده کند. به طور کلی معتقدند که سلول های اپی تلیال در اوروفارنکس، نواحی اولیه عفونت و همانندسازی ویروس می باشند. لنفوسیت های B آلوده با ویروس، ژنوم ویروس را در یک فرم نهفته در خود حمل می کنند. در بعضی از شرایط، ویروس نهفته، دوباره فعال شده و منجر به بیان ژن های ویروسی می شود که کدکننده مجموعه ای از محصولات محرک مولکول های ضد آپوپتوزی، سایتوکاین ها و مبدل های سیگنالی می باشند. اختلال در کنترل مسیرهای سلولی تنظیم کننده عملکردهای هوموستاز سلولی، منجر به ترانسفورماسیون نئوپلاستیک^۱ می شود (۵).

ارتباط قوی بین ویروس EBV با لنفوم بورکیت، لنفوم کارسینومای نازوفارنژیال، لنفوم هوچکین و لنفوم های بدخیم در بیماران با نقص ایمنی کشف شده است. علاوه بر این، مشخص شده است که تومورهای مشخص سلول های اپی تلیال مانند کارسینومای معده و کارسینومای سینه با ویروس اپشتاین-بار در ارتباط هستند. برای

¹ neoplastic transformation

سرطان زایی، ویروس اپشتاین-بار باید ژنوم خود را در سلول میزبان حفظ و از کشتن سلول میزبان اجتناب کرده و از تخریب سلول میزبان توسط سیستم ایمنی جلوگیری نماید. سرانجام ویروس باید مسیرهای کنترل رشد سلولی را فعال کند. این ویروس جهت حفظ DNA خود در سلول، عفونت نهفته را در لنفوسیت های B برقرار می کند. ژنوم ویروس در این سلول ها یا به صورت اپی زوم های حلقوی در سلول میزبان یا با ادغام شدن DNA ویروسی به داخل ژنوم میزبان، حفظ می شود. بدین ترتیب ویروس انتقال خود را به سلول های نسل جدید و در زمانی که تکثیر می شوند، تضمین می کند (۷).

EBV و لنفوم بورکیت:

لنفوم بورکیت، یک لنفومای تهاجمی مرتبط با عفونت ویروس اپشتاین-بار می باشد و به عنوان یک لنفومای غیر هوجکینی طبقه بندی می شود. لنفوم بورکیت بر اساس خصوصیات کلینیکی و اپیدمیولوژیکی، به سه گروه لنفوم بورکیت اندمیک، لنفوم بورکیت اسپورادیک و لنفوم بورکیت مرتبط با HIV طبقه بندی می شود. مطالعات نشان داده است که هر کدام از این گروه ها در انتشار جغرافیایی و درجه ارتباط با ویروس اپشتاین-بار متفاوت هستند. حدود ۹۵ درصد از موارد لنفوم بورکیت اندمیک، با ویروس اپشتاین-بار در ارتباط بوده و معمولاً در نواحی استوایی آفریقا و گینه نو یافت می شوند. در مقابل، تنها حدود ۱۰ درصد از موارد لنفوم بورکیت اسپورادیک، بالغین جوان و کودکان در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می دهند و ۴۰ درصد از موارد لنفوم بورکیت مرتبط با HIV از لحاظ ویروس اپشتاین-بار مثبت می باشند (۱۰).

ساب تایپ های مختلف لنفوم بورکیت در تظاهرات بالینی با هم تفاوت دارند. به طوری که لنفوم بورکیت اندمیک، استخوان های فک و صورت را تحت تأثیر قرار داده و باعث ایجاد تومورهایی در این نواحی می شود؛ در حالی که لنفوم بورکیت اسپورادیک، به طور شایع، روده و دستگاه تنفسی فوقانی را تحت تأثیر قرار می دهد

و باعث تشکیل تومور در حلقه والدیر^۱ می شود. به طور مشخص، لنفوم بورکیت مرتبط با HIV گره های لنفاوی و مغز استخوان را تحت تأثیر قرار می دهد. در هر سه تیپ لنفوم بورکیت، میزان ابتلا در مردان بیشتر از زنان می باشد (۵).

مکانیسمی که توسط آن، ویروس اپشتاین-بار در ایجاد و پیشرفت لنفوم بورکیت شرکت می کند، به طور کامل شناخته نشده است. لنفوم بورکیت مرتبط با ویروس اپشتاین-بار نشان می دهد که مجموعه ای از میان کنش های بین ویروس با لنفوسیت های B زمینه را برای پیشرفت لنفوم بورکیت مهیا می کند. عفونت مالاریا در مناطق اندمیک، به عنوان یکی از کوفاکتورهای مورد نیاز برای پیشرفت لنفوم بورکیت شرکت می کند. در همه اشکال لنفوم بورکیت، فعال سازی انکوژن c-myc از طریق جا به جایی آن به داخل ناحیه ایمونوگلوبولین، یک عامل کلیدی برای سرطان زایی است. در ۸۰ درصد از همه موارد لنفوم بورکیت، جا به جایی ژن C-myc از کروموزوم ۸ به ۱۴ و هم چنین جا به جایی های دیگری از قبیل؛ جا به جایی از کروموزوم ۸ به ۲۲ و یا ۸ به ۲ مشاهده می شود. این جا به جایی، به فعالیت آنزیمی AID وابسته است. این آنزیم به شدت در مراکز زایای لنفوسیت های B بیان می شود که پدیده تعویض کلاس آنتی بادی و هایپرمتاسیون ناحیه متغیر ایمونوگلوبولین به آن وابسته است. ژن c-myc فعال شده، بعد از جا به جایی می تواند منجر به رشد و تکثیر سلول شود (۱۱).

EBV و لنفوم هوچکین^۲

لنفوم هوچکین، حدود ۱ درصد از همه سرطان ها و ۳۰ درصد از بدخیمی های لنفوئیدی را در سراسر جهان تشکیل می دهد. مطالعات اپیدمیولوژیکی لنفوم هوچکین، تنوع قابل ملاحظه ای از رخداد را بر حسب سن،

¹ waldeyer's ring

² hotchkkin lymphoma

جنس، نژاد، منطقه جغرافیایی و شرایط اقتصادی - اجتماعی نشان می دهد. نقشی که ویروس اپشتاین-بار در لنفوم هوچکین بازی می کند، هنوز به طور کامل مشخص نشده است. شواهدی از قبیل؛ افزایش خطر در افرادی که در گذشته به مونونوکلئوز عفونی^۱ مبتلا شده اند، تیتراژ آنتی بادی افزایش یافته علیه آنتی ژن کپسید ویروسی و هم چنین اثبات حضور ویروس در سلول های بدخیم، ویروس اپشتاین-بار را به لنفوم هوچکین مرتبط می کند. لنفوم هوچکین همراه با گسترش سلول های هوچکین و سلول های HRS^۲ که لنفوسیت های B ترانسفورم شده را نشان می دهد، مشخص می شود (۴).

خصوصیت سلول های HRS فعال سازی مداوم فاکتور رونویسی ضد آپوپتوزی NF-kB است که برای بقای سلول های HRS ضروری می باشد. سلول های HRS اغلب متحمل جهش ژنی مخرب در ناحیه متغیر ایمونوگلوبولین می شوند و بنا بر این بیان گیرنده لنفوسیت B در آن ها از دست می رود. لنفوسیت های B موجود در مراکز زایایی که متحمل چنین جهش هایی می شوند، به طور طبیعی توسط آپوپتوز در این مراکز زایا حذف می گردند. سناریوی رایج برای لنفوم بورکیت این است که بیان LMP-2A و LMP-1 ممکن است به ترتیب توسط تقلید سیگنالینگ BCR و CD 40 از آپوپتوز ممانعت کند. نشان داده شده است که سلول های HRS در لنفوم هوچکین به عنوان یکی از عوامل فرار از سیستم ایمنی، سایتوکاین های مهارکننده ایمنی مانند IL-10, TGF- β و IL-13 را تولید می کنند (۷).

¹ infectious mononucleosis

² Hodgkin and Reed/Sternberg cells

لنفومای سلول های T/NK بینی:

لنفومای سلول های T/NK بینی تومور نادری می باشد که اغلب با ویروس اپشتاین-بار مرتبط بوده و در آسیا و به ویژه در چین، شایع است. سلول های لنفوم T/NK بینی، چندین خصوصیت منحصر به فرد ژنوتیپی و فنوتیپی از خود نشان می دهند. این خصوصیات شامل بیان مارکر CD 56 سلول های NK، نبود آنتی ژن های لنفوسیت T و فقدان بازآرایی ژنی گیرنده لنفوسیت T می باشد. ناحیه بینی به طور رایج درگیر می شود؛ اما ممکن است تومور در نواحی دیگری مانند پوست، بیضه، کلیه و قسمت فوقانی دستگاه گوارشی ظاهر شود (۴).

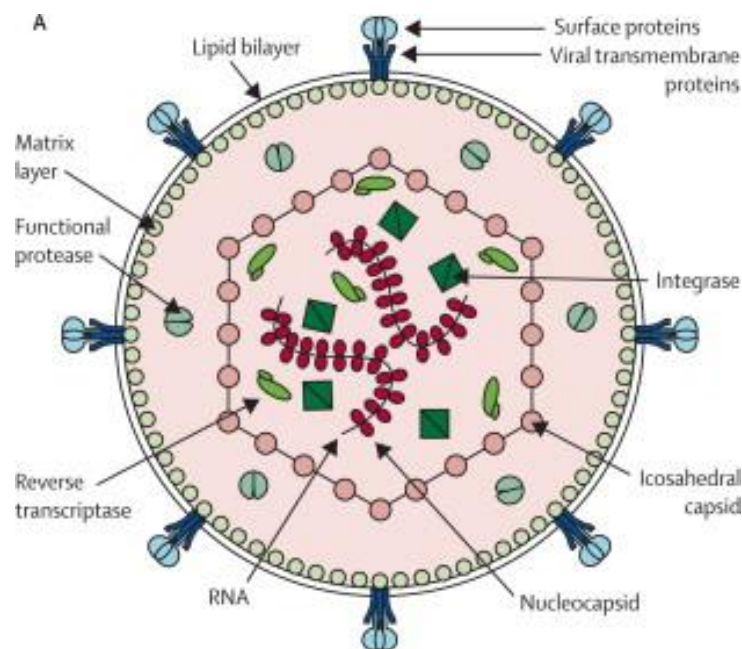
ترکیبات ضد EBV:

چندین ترکیب ضد ویروسی با عملکرد ضد ویروس اپشتاین-بار وجود دارند. این داروها شامل گان سیکلوویر، فام سیکلوویر، آسیکلوویر، والاسیکلوویر، فوسکارنت و سیدوفوویر می باشد. آسیکلوویر و گان سیکلوویر داروهای انتخابی نیستند؛ زیرا در اختلالات لنفوئیدی مرتبط با EBV، ویروس به صورت لیتیک همانندسازی نمی کند و آنزیم تیمیدین کیناز ویروسی بیان نمی شود. برای غلبه بر این مشکل، آرژنین بوتیرات^۱ که به طور انتخابی می تواند ژن های تیمیدین کیناز ویروس را در سلول های لنفوما فعال کند، همراه با گان سیکلوویر تجویز می شود. فوسکارنت، به طور مستقیم علیه DNA پلیمراز ویروسی عمل می کند و به حضور آنزیم تیمیدین کیناز ویروسی وابسته نیست سیدوفوویر نیز علیه DNA پلیمراز ویروسی عمل می کند و یک ممانعت کننده بالقوه همانندسازی ویروس در محیط آزمایشگاه می باشد (۶).

¹ arginine butyrate

۱-۶-۴ ویروس لنفوتروپیک سلول های T انسانی تیپ ۱

اولین مرحله برای کشف رتروویروس های سرطان زا به سال ۱۹۷۷ بر می گردد؛ جایی که نوع خاصی از لوکمی سلول های T تحت عنوان لوکمی سلول T بزرگسالان توسط کیوشی تاکاتسوک^۲ و همکاران در بزرگسالان ژاپنی شناسایی گردید. بیماران^۳ ATL مانند افراد مبتلا به بورکیت لنفوما دارای انتشار جغرافیایی مشخص و خاصی هستند. رابرت گالو^۴ و همکاران در سال ۱۹۸۰ فعالیت رونوشت برداری معکوس و حضور رتروویروس ها را در سلول های کشت شده لنفومای سلول های T ثابت کردند. این رتروویروس تحت عنوان ویروس لنفوتروپیک سلول T یا HTLV نام گذاری گردید (۶، ۹).



تصویر ۱-۵ تصویر شماتیک ویروس HTLV1 و اجزای تشکیل دهنده آن

¹ HTLV^۱

² Kiyoshi J. Takasaki

³ Adult T-cell leukemia/lymphoma

⁴ robert gallo

ارتباط بین HTLV و بیماری ATL زمانی تأیید شد که یوری هینوما و همکاران وجود ذرات ویروسی خارج سلولی را در سلول های افراد بیمار ATL مشاهده کردند. علاوه بر آن، در یکسانی توزیع جغرافیایی بیماری ATL با شیوع آلودگی ۱-HTLV و نیز وجود آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن بیان شده در سلول های T آلوده به HTLV-1 در بیماران ATL باعث اثبات ارتباط بین این دو شد، مطالعات تکمیلی بعدی رتباط بین HTLV-1 و سرطان را تأیید کردند. از تمام بیماران مبتلا به ATL، DNA پروویروسی HTLV-1 قابل جداسازی می باشد. آلودگی با HTLV-1 باعث القای نامیرایی در سلول های T انسانی می شود (۷).

در سراسر دنیا بین ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر آلوده به HTLV-1 وجود دارند که به همان میزان، پیش بینی شیوع برای مبتلایان به بیماری ATL وجود دارد و سالانه ۳۳۰۰ نفر به این لوکمی مبتلا می گردند. ابتلا به این لوکمی فقط در درصد کمی از مبتلایان به HTLV-1 و آن هم در دهه های بعد ابتلا به ویروس رخ می دهد. از سوی دیگر کمتر از ۲ درصد از افراد آلوده به HTLV-1 با یک بیماری پیشرونده تخریب میلین نورون حرکتی بالایی که به فلج اسپاسمی گرمسیری مرتبط با HTLV-1 که (HAM/TSP) نامیده می شود درگیر می شوند. این بیماری با نقص حرکتی و حسی خصوصاً با کمی بی اختیاری و ناتوانی همراه می باشد. ویروس HTLV-2 در سال ۱۹۸۱ از بیماران با لوکمی سلول موئی^۲ جدا گردید. این تیپ دارای پاتوژنیسته کمی بوده و توسط کمیته بین المللی تحقیق بر روی سرطان، جزء عوامل سرطان زا طبقه بندی نمی شود. در حال حاضر، مکانیسم مولکولی که توسط آن HTLV-1 باعث سرطان می شود در حال بررسی و مطالعه است؛ اما دخالت و نقش پروتئین کد شده ویروسی (tax) در ایجاد سرطان مشخص شده است با این حال برعکس لوکمی های مشخص ایجاد شده توسط رتروویروس های حیوانی که با ادغام یک موتاژن در ژنوم میزبان باعث ایجاد سرطان می شوند،

¹ HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis

² Hair cell leukemia

در این ویروس مکانیسمی که توسط آن tax ترانسفورماسیون را القاء می کند، شامل ایجاد اختلال و آشفته‌گی در چندین مسیر مختلف تنظیمی رشد سلولی، مکانیسم های اپی ژنتیک و تداخل با سیستم تعمیر و بازسازی DNA می باشد. مشابه با مکانیسم تومورزایی 1-LMP در EBV پروتئین ضروری tax به طور قوی-AP-1 و NF-κB را فعال می کند که اثر تقویتی بر روی تکثیر لنفوسیت ها دارد. از سوی دیگر tax با بسیاری از فاکتورهای تنظیمی تعمیر کروماتینی مثل SWA/SNF و هیستون داستیلاز^۱ اثر متقابل داشته و باعث ممانعت از تعمیر DNA و ناپایداری ژنومی شده و سرانجام موجب ترانسفورماسیون می شود(۷).

تا به امروز هیچ گونه واکسن علیه ویروس HTLV-1 در دسترس نیست و درمان فقط به مقابله با عفونت های فرصت طلب ناشی از سرکوب ایمنی ایجادشده توسط ATL محدود گشته است(۴).

۱-۶-۵ هریس ویروس مرتبط با سارکوم کاپوسی^۲(KSHV):

ویروس HHV8 به عنوان KSHV و عضوی از خانواده هریس ویریده و در زیرخانواده گاما هریس ویرینه^۳ قرار داشته و مثل اکثر ویروس های این خانواده، از طریق بزاق و مایعات بدن منتشر می شود(۹).

سارکوم کاپوسی یک تومور آنژیوپرولیفراتیو^۴ است که در سال ۱۸۷۲ توسط مورتیس کاپوسی^۵ پاتولوژیست مجارستانی شرح داده شد. سارکوم کاپوسی یک نئوپلاسم چند کانونی پیچیده است که با تکثیر سلول های دوکی شکل اندوتلیال و ایجاد لژیون ارغوانی مشخص تا تشکیل دمل در غشای پیوندی بروز پیدا می کند و با رگ زایی

^۱ histone deacetylase

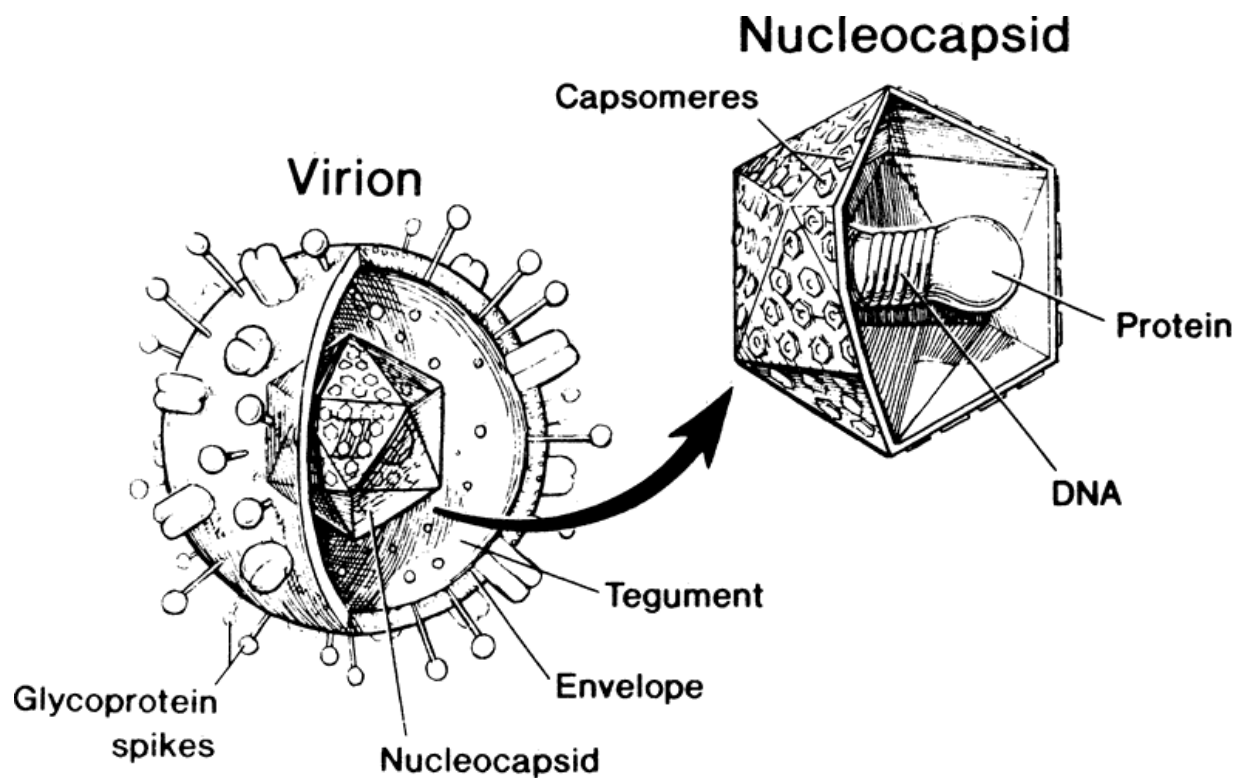
^۲ Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

^۳ gamma herpesvirinae

^۴ angioproliferative

^۵ moritz kaposi

گسترده و قابل توجه و التهاب همراه است . افراد مبتلا دارای انتشار جغرافیایی خاصی هستند؛ به طوری که شیوع بالای آن در برخی کشورهای آفریقایی، شیوع متوسط در کشورهای مدیترانه و شرق اروپا و شیوع کم در شمال آمریکا و کشورهای غرب اروپا باعث شده تا تلاش برای یافت عوامل دخیل در این بیماری آغاز گردد(۸).



تصویر ۱-۶ تصویر شماتیک از ویروس HHV8 و اجزای تشکیل دهنده آن

در سال ۱۹۸۰ افزایش فراوانی شدت بروز سارکوم کاپوسی در افرادی که به مرحله ایدز رسیده بودند و در مرحله سرکوب ایمنی قرار داشتند، رخ داد. بیماری هم زمان ایدز و سارکوم کاپوسی یک شرایط تهدیدکننده حیات می باشد که توسط ادم ناحیه ای و لزیون های بدشکل پوستی هم زمان با درگیری ارگان های داخلی، حفره دهانی،

خونریزی و مشکلات تنفسی بروز پیدا می کند. گر چه ابتدا تصور می شد که HIV عامل سارکوم کاپوسی می باشد، اما مطالعات اپیدمیولوژیکی و تجربی نتوانست ارتباط بین HIV و سارکوم کاپوسی را نشان دهد. شیوع سارکوم کاپوسی از زمان معرفی و تولید و مصرف داروهای ۳ تایی ضد رتروویروسی HAART^۱ برای درمان افراد آلوده به HIV به طور قابل توجهی کاهش یافته است. اما هنوز هم سارکوم کاپوسی به عنوان سرطان شایع در کودکان آفریقایی باقی مانده است و هنوز بیشتر شیوع در جوامع کوچک و کشورهای در حال توسعه رخ می دهد. متعاقباً فهم این نکته که افزایش نرخ بروز سارکوم کاپوسی در افراد همجنس گرا که آلوده به ایدز شده اند، وجود یک عامل انتقال یابنده از راه جنسی را که متمایز از HIV بوده و باعث سارکوم کاپوسی می شود، را اثبات کرد (۷).

به کمک روش های پیشرفته مولکولی که توسط یوان چنگو پاتریک مور برای شناخت هپاتیت C به کار رفت، عامل عفونت زای درگیر در سارکوم کاپوسی نیز در سال ۱۹۹۳ کشف گردید. مطالعات دیگر وجود HHV-8 در تمامی حالت های اپیدمیولوژیک بیماری سارکوم کاپوسی چه در افراد ایدزی و چه غیر ایدزی را اثبات کرد به همین خاطر به این نوع هرپس ویروس، هرپس ویروس مرتبط با سارکوم کاپوسی اطلاق می گردد. اندکی بعد، این ارتباط KSHV با زیرگروه نادری از لنفومای غیر هوچکین سلول B به نام لنفومای اولیه ایفیوسیون سلول B^۲ و زیرمجموعه ای از بیماری چند کانونی کاستلمن^۳ نشان داده شد. وجود بیش از یک نوع بیماری توموری مرتبط با KSHV تأیید شده و این، موضوع، اطمینان بیشتری برای ماهیت تومورزایی آن محسوب می شود (۵).

^۱ highly active antiretroviral therapy

^۲ b cell primary effusion lymphoma

^۳ castleman disease

توالی ژنوم KSHV وجود حداقل ۸۹ قالب خواندن را نشان می دهد که برخی از این ها مختص هرپس ویروس هاست و از سوی دیگر، بسیاری از این ژن ها به طور شگفت آوری، از ژن های سلولی کسب شده اند که شامل آن دسته ژن های دخیل در کنترل چرخه سلولی، ژن های مهار آپوپتوز، ژن های تنظیمی سیستم ایمنی و ژن های دخیل در ارتباطات درون و بین سلولی می باشند. پس این ویروس، لنگرگاهی از ژن هایی می باشد که می تواند پتانسیل رگ زایی و سرطان زا بودن را داشته باشند(۵).

سارکوم کاپوسی مثل سایر هرپس ویروس ها، بعد عفونت، پس از طی چندین مرحله همانندسازی اولیه و انتشار، به فاز نهفتگی (برای تمام عمر) و یا فاز همانند سازی، تولید ویرون و تخریب سلول (فاز لیتیک) وارد می شود. در طی چرخه نهفتگی که انتخاب اول این ویروس می باشد، فقط چند ژن ویروسی بیان می شوند و DNA ویروس به صورت اپی زوم حلقوی در هسته باقی می ماند که طی آن، هیچ ذره ویروسی تولید نشده و یا چند ذره ویروسی کامل تولید می گردد. در این مرحله فرار ایمنی نیز مشاهده می گردد. هنوز دلیل فعال شدن مجدد ویروس معلوم نشده است(۴).

۱-۶-۶ ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)^۱:

ششمین و آخرین گروه از ویروس های سرطان زای انسانی ویروس های پاپیلومای انسانی (HPV) می باشند که چون موضوع بحث این پایان نامه می باشند به طور کامل در مبحث بعدی شرح داده می شوند.

^۱ Human Papilloma Virus

۱-۷ ویروس پاپیلومای انسانی (Human Papilloma Virus) :

ویروس پاپیلومای انسانی از خانواده ی ویروسی پاپیلوما ویریده^۱ می باشد. این ویروس ها برحسب سلول میزبان می توانند عفونت های کشنده ،مزمن، نهفته و ترانسفورم کننده ایجاد کنند. ویروس ها پاپیلومای انسانی عامل زگیل هستند و ژنوتیپ های متعدد آن با سرطان های انسان (مانند سرطان گردن رحم)^۲ مرتبط می باشند.(۴,۱).

۱-۷-۱ ساختار HPV :

پاپیلوما ویروس ها ویروس های کوچک بدون پوشش با کپسید ۲۰ وجهی هستند که ژنوم آنها DNA دو رشته ای حلقوی است. این ویروس ها پروتئین هایی را رمزدهی می کنند که رشد سلول را افزایش می دهند. افزایش رشد سلول همانند سازی لیتیک ویروسی را در سلول مجاز تسهیل می کند. اما ممکن است یک سلول غیر مجاز را به طور انکوژنی ترانسفورمه نمایند(۹).

انواع این ویروس بر اساس توالی DNA طبقه بندی شده اند. حداقل ۱۲۰ تیپ از آن شناخته شده که شامل ۱۶ گروه طبقه بندی شده اند. این ویروس بر حسب بافت حساس به HPV جلدی و HPV مخاطی تمایز پیدا می کنند. در HPV مخاطی گروهی با سرطان گردن رحم ارتباط دارد. ویروس هایی که در گروه های مشابه قرار دارند اغلب زگیل های مشابه ایجاد می کنند(۶).

¹ papillomaviridae

² Cervical cancer

۱-۷-۲ خصوصیات HPV:

- ۱- ویریون با کپسید ۲۰ وجهی
- ۲- ژنوم DNA دو رشته ای حلقوی است که در هسته همانند سازی و تجمع می شود.
- ۳- تیپ ها بر اساس ژنوتیپ ، تشابه DNA گرایش تروپیسم بافتی و ارتباط با انکوژنز مشخص می شوند.
- ۴- این ویروس ها در سلول های مجاز عفونت های لیتیک^۱ (متلاشی کننده) ایجاد می کنند اما در سلول های غیر مجاز باعث عفونت های عقیم ، یا نهفته شده یا نامیرا (ترانسفورم) شدن می شوند.
- ۵- قطر کپسید ۲۰ وجهی این ویروس ۵۰-۵۵ نانومتر است. مرکب از دو پروتئین ساختاری که ۷۲ کپسومر را تشکیل می دهند
- ۶- ژنوم این ویروس DNA حلقوی است و تقریباً ۸۰۰۰ جفت باز دارد(۹).



تصویر ۱-۷ تصویر شماتیک ویروس HPV و اجزای تشکیل دهنده آن

¹ lytic

۱-۷-۳ همانندسازی HPV:

ویروس از طریق خراش های پوست به لایه های سلول های بازال^۱ راه می یابد ژن های اولیه ی ویروس رشد سلولی را تحریک می نماید. و زمانی که سلول تقسیم می شود همانندسازی ژنوم ویروسی نیز توسط DNA پلیمراز سلول میزبان تهسیل می گردد. افزایش تعداد سلول که توسط ویروس القا شده باعث می شود لایه ی بازال و لایه ی سلول خاردار ضخیم شود به این ترتیب زگیل پدید می آید(۹).

۱-۷-۴ پاتوژنز HPV :

ویروس در اپیتلیوم فلسی پوست (زگیل) و غشاهای مخاطی (پاپیلوم ژنیتال ، دهانی و ملتحمه) همانند سازی می کنند و تکثیر اپیتلیوم را القا می نمایند. تیپ های HPV بسیار اختصاصی بافت هستند و موجب تظاهرات مختلف بیماری می شوند. زگیل به دلیل تحریک رشد سلول توسط ویروس و ضخیم شدن لایه های بازال و خاردار^۲ و همچنین طبقه دانه دار ایجاد می شود. Koilocyte ها که اختصاص به عفونت پاپیلوما ویروس دارند کراتینوسیت های بزرگ شده ای هستند که در اطراف هسته چروکیده شده هاله شفافی دارند .برای کنترل و بهبودی عفونت های HPV ایمنی ذاتی و سلولار حائز اهمیت است . HPV می تواند پاسخ های محافظت کننده ایمنی را سرکوب و یا پنهان نماید. کراتینوسیت محلی است که از نظر ایمنی شناسی برای همانندسازی در اولویت می باشد. برای فعال سازی پاسخ های سیتولوژیک محافظت کننده و تشدید بهبودی زگیل ها به پاسخ های التهابی نیازی باشد DNA ی ویروس HPV در تومورهای خوش خیم و بدخیم به ویژه در پاپیلوم های مخاطی یافت

¹ Basal layer

² Spiratum spinosum

می شوند HPV16 و HPV 18 موجب پاپیلوما و دیس پلازی^۱ گردن رحم شده و حداقل ۸۵٪ سرطان های گردن رحم حاوی HPV-DNA الحاق شده هستند. پروتئین های E6 و E7 در HPV-16 و HPV-18 به عنوان انکوژن شناخته شده اند. زیرا این پروتئین ها به پروتئین های سرکوبگر رشد سلولی (ترانسفورماسیون-سرکوبگر) وصل شده و آنها را غیر فعال می سازند E6. به پروتئین P53 وصل شده و آنرا تخریب می کند و E7 به پروتئین Rb وصل شده و آن را غیر فعال می کند. بدون وجود این موانع ، سلول به جهش ، اشتباهات کروموزومی یا عملکرد کوفاکتور بسیار حساس شده و در نتیجه سرطان ایجاد می شود(۶، ۹).

در مواردی که عفونت با انواع کم خطر HPV نظیر ۶ و ۱۱ اتفاق بیافتد، ژنوم ویروسی به صورت اپی زومال باقی مانده و این DNA خارج کروموزومی به بیان ژن می پردازد . اما در مورد انواع پر خطر HPV ، نظیر ۱۶ و ۱۸ که در ارتباط با دیس پلازی ناحیه تناسلی و سرطان هستند، این موضوع متفاوت می باشد (۱۲).

HPV ، از طریق زخم های میکروسکوپی اپی تلیوم سنگ فرشی را آلوده می کند و چرخه سلولی آن وابسته به وضعیت تمایز بافت اپی تلیال میزبان می باشد . زمانی که ژنوم ویروسی به صورت اپی زوم به تعداد ۵۰-۱۰۰ کپی در هسته سلول های لایه بازال اپی تلیوم وجود دارد همانندسازی ویروسی هم زمان با DNA کروموزومی و به دنبال تقسیم سلولی رخ می دهد. استقرار و بقای ژنوم HPV در ارتباط با بیان پروتئین های اولیه E1-E2^۲ و به دنبال E4-E5-E6-E7 می باشد که در همانندسازی و رونویسی DNA در سلول میزبان دخیل هستند، می باشد .هم

¹ dysplasia

² Early Genes

زمان با حرکت سلول های آلوده، بیان ژن های تأخیری اتفاق می افتد و پروتئین های L1 و L2^۱ کپسید تولید می کنند و در لایه های فوقانی، ویریون تشکیل می شود(۴).

۱-۷-۵ اپیدمیولوژی HPV:

کپسید ویروس HPV به غیر فعال شدن مقاوم است و می تواند از طریق اشیای بی جان مانند سطوح پیشخوان سطح میز یا اثاثیه، کف حمام و حوله منتقل می شود. دفع بدون علامت ممکن است انتقال را افزایش دهد. زگیل های معمولی در کودکان و نوجوانان شایع تر است. پاپیلوم حنجره در کودکان خردسال و افراد میانسال روی می دهد. پاپیلوما ویروس انسانی احتمالاً شایع ترین عفونت منتقله جنسی در جهان می باشد. حداقل ۲۰ میلیون نفر در آمریکا آلوده به HPV می باشند که سالانه ۶ میلیون مورد ژنیتال نیز به این آمار اضافه می شود. HPV در ۹۹ درصد سرطان های گردن رحم وجود دارد. خطر HPV-16 و HPV-18 و HPV-31 و HPV-45 زیاد است HPV-6 و HPV-11 تیپ هایی از HPV هستند که خطر آن ها برای کارسینوم گردن رحم کم است(۹). HPV دومین عامل سرطان منجر به مرگ در زنان می باشد (تقریباً ۱۲۰۰۰ مورد و ۴۰۰۰ مرگ در سال در ایالات متحده). تقریباً ۱۰٪ از زنان آلوده به تیپ هایی از HPV که خطر آنها زیاد است دچار دیس پلازی^۲ گردن رحم می شوند که مرحله پیش سرطانی می باشد(۶).

¹ Late Genes

² dysplasia

۱-۷-۶ انتقال HPV

ویروس پاپیلوم انسانی از طریق تماس با پوست یا مخاط تناسلی آلوده منتقل می‌شود. زگیل‌های تناسلی به دلیل بالا بودن بار ویروسی خود بسیار عفونی هستند؛ تا ۶۵ درصد از تماس‌های جنسی به آلوده شدن به این ویروس منتهی می‌شوند. دوره کمون (نهفتگی) معمول زگیل‌های بالینی از سه هفته تا هشت ماه و به‌طور متوسط ۲/۹ ماه است. امکان دارد دهان به انواع تناسلی HPV آلوده شود، اما خطر انتقال آن کمتر است. انتقال در دوره بین بیستمین هفته زندگی جنین تا یک ماه پس از تولد (Perinatal) نیز ممکن است رخ دهد، اما این انتقال به ندرت صورت می‌گیرد (۶).

نزدیکی جنسی از راه مقعد را به ایجاد زگیل‌های داخل و اطراف مقعد در افراد مفعول در این نزدیکی‌های جنسی ربط داده‌اند، اما این زگیل‌ها در تمام موارد با این نوع نزدیکی جنسی مرتبط نمی‌باشند. در افرادی که دارای سابقه این نوع نزدیکی جنسی نمی‌باشند، آلودگی گردن رحم و مقعد در اغلب اوقات با هم مشاهده می‌شوند (۹).

عفونت HPV از راه‌های زیر کسب می‌گردد:

۱- تماس مستقیم از طریق خراش‌های کوچک پوست یا مخاط

۲- تماس جنسی

۳- حین زایمان و عبور از کانال زایمانی آلوده (۴).

۱-۷-۷ عوامل خطر HPV

تماس تناسلی عامل خطر اصلی اکتساب HPV است، و این خطر با بیشتر شدن تعداد کسانی که شخص با آنها رابطه جنسی دارد افزایش می‌یابد. دیگر عوامل خطر شامل داشتن رابطه جنسی با چند نفر، نزدیکی جنسی در سن پایین، عدم استفاده از کاندوم در تمام موارد برقراری نزدیکی جنسی، و دارا بودن سابقه عفونت‌هایی است که از طریق نزدیکی جنسی منتقل می‌شوند (۶).

کاربرد کاندوم تنها از ۷۰ درصد از موارد انتقال HPV پیشگیری می‌کند زیرا، حتی با استفاده از آن، تماس با پوست اندام‌های تناسلی برقرار می‌شود. کشیدن سیگار با عفونت پایدار HPV مرتبط است، گرچه حذف نمودن رفتارهای پیچیده کننده مرتبط با مصرف توتون مشکل است. در مردانی که بیش از ده سیگار در روز می‌کشند، احتمال مبتلا شدن به زگیل‌های جنسی دو برابر مردانی است که سیگار نمی‌کشند. در زنانی که بیش از ۲۰ سیگار در روز می‌کشند، احتمال آلودگی پایدار به HPV بیشتر از زنانی است که کمتر از ده سیگار در روز می‌کشند. در زنانی که دچار نئوپلازی درجه ۳ داخل اپی‌تلیالی فرج^۱ هستند و پس از درمان به کشیدن سیگار ادامه می‌دهند، احتمال مبتلا بودن به بیماری پایدار ۳۰ برابر بیشتر است (۹).

۱-۷-۸ سندروم های بالینی HPV

تروپیسم بافتی و ظهور بیماری ارتباط مستقیم به نوع پاپیلوما ویروس دارد. ویروس در لایه ی بازال پایدار است و سپس در کراتینوسیت های تمایز یافته انتهایی تولید می شود. بعضی انواع آن با دیس پلازی مرتبط هستند که

^۱ CIN

در اثر عوامل کمکی سرطانی می شوند. DNA اختصاصی انواع HPV در کروموزوم های سلول های تومور وجود دارد (DNA الحاق شده)(۱۲).

سندرم های بالینی شامل :

الف- تومورهای خوش خیم سروگردن: پاپیلوما های منفرد دهانی خوش خیم ترین تومورهای اپی تلیال حفره دهانی هستند. این تومورها ساقه ای فیبری عروقی دارند که سطح آن معمولا چین خورده است ونمای برآمده دارند. این تومورها در هر گروه سنی روی می دهند و معمولا منفرد هستند که بعد از جراحی به ندرت عود میکنند.

ب- پاپیلومای حنجره ای: معمولا با HPV-6 و HPV-11 مرتبط هستند و شایع ترین تومورهای خوش خیم حنجره می باشند. پاپیلوماتوز حنجره ای می تواند حیات کودک را تهدید کند زیرا ممکن است راه هوایی را مسدود نماید. گاهی ممکن است پاپیلوما در قسمت پایین تر ، در تراشه و داخل برونش یافت شود.

ج - زگیل های مقعدی-تناسلی:زگیل های تناسلی (کوندیلوما آکومیناتا)^۱ تقریبا منحصرأ در سطح اپی تلیوم فلسی دستگاه خارجی و نواحی اطراف مقعد روی می دهد. تقریبا ۹۰ % آن ها توسط HPV-6 و HPV-11 ایجاد می شوند. ضایعات مقعدی-تناسلی آلوده شده با این تیپ های HPV در افراد سالم به ندرت بدخیم می شوند.

د- دیس پلازی و نئوپلازی سرویکس^۲: عفونت HPV دستگاه تناسلی اکنون به عنوان بیماری شایع منتقله از راه تماس جنسی^۳ است و ممکن است هفته ها یا ماه ها بعد از تماس جنسی ظاهر شود. تغییرات سیتولوژیکی (سلول های Koilocytotic) حاکی از عفونت HPV است که درپاپ اسمیرهای گردن رحم که با روش

¹ condyloma acuminata

² cervix

³ STD

پاپانیکولا رنگ آمیزی شده اند تشخیص داده می شوند. عفونت دستگاه تناسلی زنانه با HPV تیپ های ۱۶-۱۸-۳۱-۳۳-۴۵-۵۲ و به ندرت با سایر تیپ های HPV با سرطان و نئوپلازی داخل اپیتلیال گردن رحم (CIN) مرتبط می باشند(۹).

اولین تغییرات نئوپلاستیک را که با میکروسکوپ نوری مشاهده می شوند دیس پلازی می نامند. تصور می شود که سرطان گردن رحم از طریق تغییرات سلولی پیوسته پیشرونده ، از شکل خفیف (نئوپلازی داخل اپی تلیال گردن رحم (CIN) تا متوسط و شدید (Carcinoma in situ) به صورت رویداد های متوالی ظرف ۱ تا ۴ سال روی می دهد. مبادرت به تهیه پاپ اسمیرهای روتین و منظم می تواند از آن پیشگیری نموده یا موجب درمان سریع و بهبودی سرطان گردن رحم گردد(۱۲).

جدول ۱-۲ سندرم های بالینی ایجاد شده توسط HPV و ژنوتایپ های متناظر آن سندرم

انواع HPV		سندرم
غیر شایع	شایع	
		سندرم های پوستی
		زگیل های پوستی
۲، ۴	۱	زگیل های ستاره ای
۱ و ۷، ۲۶، ۲۹	۲، ۴	زگیل های معمولی
۲۷، ۳۸، ۴۱	۳ و ۱۰	زگیل های مسطح
۹ و ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۱-۲۵، ۳۸، ۴۶	۵ و ۸، ۱۷، ۲۰، ۳۶	اییدرمودیس پلازی وروسی فرمیس (Epidermodysplasia Verruciformis)
		سندرم های مخاطی
		تومورهای خوش خیم سر و گردن
—	۶، ۱۱	پاپیلوما ی حنجره
۲، ۱۶	۶، ۱۱	پاپیلوما ی دهان
—	۱۱	پاپیلوما ی ملتحمه
		زگیل های مقعدی - تناسلی (آنوژنیتال)
۱، ۲، ۱۰، ۱۶، ۳۰، ۴۴، ۴۵	۶، ۱۱	کوندیلوما آکومیناتوم
۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲	۱۶، ۱۸ (خطر بالا)	نئوپلازی داخل اپی تلیال سرویکال، سرطان
۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۸، ۶۹، ۷۳، ۸۲		

۱-۷-۹ تشخیص آزمایشگاهی HPV:

زگیل را می توان بر اساس خصوصیات نمای هیستولوژیک آن، که شامل هیپرپلازی^۱ سلول های خاردار و تولید فراوان کراتین (hyperkeratosis) می باشد به روش میکروسکوپی تایید نمود عفونت پاپیلوماویروس را می توان در پاپ اسمیر و به کمک وجود سلول های اپی تلیال فلسی (سیتوپلاسم واکوئل دار) که مدور و به صورت توده هستند تشخیص داد. کاوشگرهای DNA مولکولی و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) بر روی نمودار سواب گردن رحم و بافت برای تشخیص و تعیین تیپ عفونت HPV روش های انتخابی می باشند. پاپیلوماویروس ها در کشت سلول رشد نمی کنند و آزمایش های آنتی بادی ها HPV غیر از بررسی های تحقیقاتی به ندرت استفاده می شوند(۹).

۱-۷-۱۰ درمان و پیشگیری HPV:

تقریباً در ۵۰% موارد زگیل ها به طور خود به خود فروکش می کنند اما ممکن است ماه ها تا سالها طول بکشد. برای پیشگیری از انتشار زگیل به سایر قسمت های بدن می توان آنها را با روش های مختلف از جمله سرما درمانی (Surgical cryotherapy) سوزاندن بافت (Electrocautry) یا روش های شیمیایی مانند محلول پودوفیلین^۲ ۱۰% تا ۲۵% بر می دارند(۶).

برای برداشتن پاپیلوما ی حنجره نیاز به جراحی است. محرک های پاسخ ذاتی و التهابی نظیر ایمیکیمود (aldara) انترفرون می تواند بهبودی را سریع تر کند. مصرف موضعی یا داخل ضایعه ای سیدوفوویر با کشتن انتخابی سلول

^۱ hyperplasia

^۲ podophyllin

های آلوده به HPV می تواند زگیل را درمان نماید. گارداسیل^۱ واکسن جدید چهار ظرفیتی HPV مورد تایید FDA حاوی پروتئین L1 اصلی کپسید است که در داخل ذرات شبه ویروس ۶-۱۱-۱۶-۱۸ HPV تجمع یافته (مونتاژ شده) است. این واکسن می تواند از عفونت جلوگیری کرده و در نتیجه بروز زگیل های مقعدی-تناسلی و سرطان گردن رحم را کاهش می دهد که در مورد آن بیشتر بحث خواهد شد(۹).

این واکسن از تشکیل زگیل های تناسلی و سرطان گردن رحم پیشگیری می کند، و واکسیناسیون در سه نوبت (نوبت اول، یک تا دو ماه بعد، و شش ماه بعد) صورت می گیرد. واکسن دو ظرفیتی HPV (سرواریکس)^۲ از افراد در برابر انواع ۱۶ و ۱۸ محافظت می کند، اما نمی تواند از آنها در برابر انواع ۶ و ۱۱ محافظت نماید. این واکسن برای استفاده در دختران و زنان ۱۰ تا ۲۵ ساله تأیید شده است، و واکسیناسیون در سه نوبت (نوبت اول، یک تا دو ماه بعد، و شش ماه بعد) انجام می شود(۹).

در مرحله سوم سه ساله آزمایش بالینی^۳ کارآیی واکسن چهار ظرفیتی در پیشگیری از بیماری تناسلی مرتبط با HPV نوع ۶، ۱۱، ۱۶، و ۱۸ بررسی شد. این واکسن در پیشگیری از ضایعات پیش سرطانی (CIN 2 و CIN 3) و زگیل های تناسلی در زنانی که در معرض این ویروس قرار نگرفته بودند تقریباً ۱۰۰ درصد مؤثر بود. در یک مطالعه دیگر، مشخص شد کارآیی واکسن چهار ظرفیتی در پیشگیری از ضایعات درجه بالای پیش سرطانی گردن رحم (HPV 16, 18) در طی یک دوره سه ساله در زنانی که در معرض ویروس قرار نگرفته بودند ۹۸ درصد است. اما، داده های مربوط به گروهی که قرار بود درمان شوند (شامل زنان فعال از نظر جنسی که در

¹ Gardasil

² cervarix

³ Clinical trial

معرض ویروس HPV قرار گرفته بودند) حاکی از آن است که این واکسن در این گروه از جمعیت ویژگی پیشگیری‌کننده کمتری داشت (۱۳).

کشورهای در حال توسعه از همه بیشتر به واکسیناسیون HPV احتیاج دارند. در این کشورها، در بیشتر زنان تست پاپ اسمیر هرگز صورت نمی‌گیرد و سرطان گردن رحم یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر زنان است. تقریباً ۸۰ درصد از موارد سرطان گردن رحم در کشورهای در حال توسعه ایجاد می‌شود. در جهان، هر ساله حدود ۵۲۹۰۰۰ مورد سرطان گردن رحم تشخیص داده می‌شود، و ۲۷۵۰۰۰ مورد مرگ‌ومیر را به این بیماری نسبت داده می‌دهند. با استفاده از واکسنی که بر علیه رایج‌ترین چهار یا پنج نوع پرخطر HPV مؤثر باشد، می‌توان از بروز ۸۰ تا ۹۰ درصد از موارد بروز سرطان گردن رحم در جهان جلوگیری نمود. اما قیمت واکسن‌های موجود در دسترس بودن آنها را در آن نواحی محدود می‌سازد که بیشتر از همه به این واکسن‌ها احتیاج می‌باشد (۱۳).

۱-۷-۱۱ خصوصیات ژنتیکی HPV :

ژنوم HPV از نظر عملکرد به سه منطقه تقسیم می‌شود: اولین ناحیه، ناحیه غیر کد شونده به نام ناحیه کنترلی طولانی (LCR) یا ناحیه تنظیمی می‌باشد. این منطقه شامل پروموتور اصلی اولیه به نام P97 و سکانس‌های تنظیم‌کننده همانندسازی DNA می‌باشد همچنین بیش‌ترین شیوع ژنوم ویروسی در این منطقه وجود دارد دومین ناحیه، منطقه زودرس^۱ بوده که شامل E1-E2-E4-E5-E6-E7 می‌باشد و در همانندسازی و سرطان

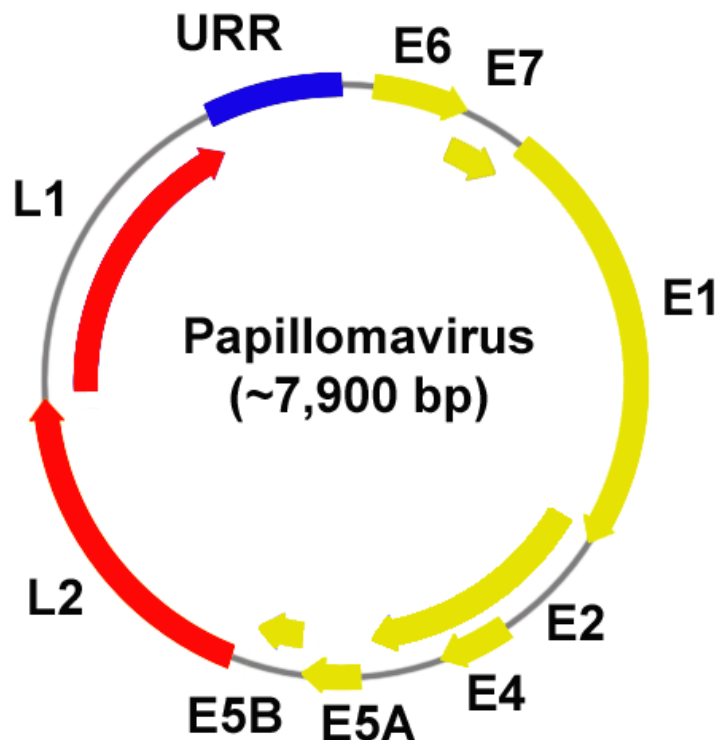
¹ Early

زایی ویروسی دخالت دارد. سومین ناحیه، منطقه تأخیری^۱ می باشد که پروتئین های ساختاری L1 و L2 را برای کپسید ویروسی کد می کند(۸).

HPV در طول طول سیکل سلولی خود، رونوشت های پلی سیسترونیک مختلفی را بیان می کنند، بنابراین بیان محصولات ژنی ویروس، با تمایز سلول میزبان هماهنگ می باشد. علاوه بر این، در طول تمایز کراتینوسیت ها، رونویسی از چندین پروموتر مختلف شروع می شود. رونویسی ویروسی توسط فاکتورهای رونویسی سلولی کنترل می شود، این فاکتورهای سلولی به وسیله پروتئین های کد شونده توسط E2 به LCR^۲ متصل می شوند. تصور بر این است که اختصاصیت عفونت HPV به اپی تلایل مربوط به عناصر کنترلی در Enhancer و پروموتر در ناحیه LCR ویروسی می باشد. همانندسازی ویروسی از یک ناحیه، به نام ناحیه آغاز همانندسازی (ori) شروع می شود و به فاکتورهای کد شونده توسط ویروس (E1 و E2) وابسته است. HPV دو پروتئین اصلی E6 و E7 را نیز کد می کند، که این دو پروتئین با یکدیگر الگوی بیان و فعالیت بسیاری از ژن ها و پروتئین های سلولی را تغییر می دهند. این ژن ها، در رده سلولی مشتق شده از سرطان باقی مانده و بیان می شوند و برای نامیرا کردن سلول میزبان کافی می باشند. همچنین این ویروس، پروتئین E5 را کد می کند که این پروتئین، پروتئین فرعی ترانسفورم کننده در HPV و پروتئین اصلی ترانسفورم کننده در BPV است(۱۲).

¹ Late

² Locus control region



تصویر ۸-۱ شکل شماتیک ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی

۸-۱ سرطان دهانه رحم :

بررسی ارتباط بین سرطان دهانه رحم و آلودگی با ویروس پاپیلومای انسانی از دهه ۷۰ میلادی آغاز شد و بعد از آن تحقیقات اپیدمیولوژیک بالینی نشان داد آلودگی با ویروس HPV نقش بسیار پررنگی در ابتلا و پیشرفت سرطان دهانه رحم بازی می کند تا آنجا که موارد سرطان دهانه رحم بدون آلودگی با HPV استثناء به شمار می رود. امروزه نقش ویروس HPV در ابتلای به سرطان دهانه رحم به اثبات رسیده است و آلودگی با این ویروس تقریباً در تمامی موارد سرطان های دهانه رحم (تا ۹۵ درصد موارد) مشاهده شده است (۱۴).

۱-۸-۱ آناتومی سرویکس:

سرویکس بخش انتهایی و باریک رحم می باشد این بخش به شکل مخروطی ناقص در قسمت سر می باشد که مسیرش به طرف پایین و عقب است. اندازه آن در زنان زایمان نکرده بالغ ۳ و ۵ و ۲ سانتی متر می باشد. واژن به صورت مایل به اطراف سرویکس متصل شده است و آن را به دو قسمت سوپرا واژینال (فوق واژنی) و واژینال تقسیم می نماید. سرویکس از قدام واژن با زاویه وارد میشود و در اغلب زنان بخش واژینال در تماس با دیواره خلفی واژن می باشد. قسمت واژینال به طرف بخش فوقانی واژن پیش آمدگی دارد و بین فورنیکس قدامی و خلفی به صورت یک برآمدگی محدب بیضی شکل قرار گرفته است. یک روزنه کوچک معمولاً گرد و یا شکاف مانند در مرکز این برآمدگی قرارداد که سوراخ خارجی را تشکیل می دهد (۱۵).

این سوراخ محوطه رحم را به واژن متصل می کند و بوسیله لبه های قدامی و خلفی احاطه شده است. کانال سرویکال از سوراخ خارجی تا سوراخ داخلی جایی که به محوطه رحم متصل می شود گسترش یافته است. این کانال دوکی شکل است و در عریض ترین قسمت تقریباً ۸ میلیمتر عرض دارد. ناحیه ای از رحم که بین سوراخ داخلی و جسم رحم قرارداد ايسموس یا تنگه نامیده می شود (۱۵, ۱۶).

۱-۸-۲ بافت شناسی سرویکس:

توجه دقیق به بافت شناسی سرویکس به کمک می آند تا چگونگی ایجاد و محل ضایعات خوش خیم ، پیش سرطانی و سرطانی سرویکس را درک نماییم . سرویکس اساساً از دو نوع بافت پوششی (اپیتلیوم^۱) متفاوت تشکیل شده است : اپیتلیوم اسکوآموس^۲ (سنگفرشی) و اپیتلیوم کالمنار^۳ (استوانه ای)

بافت پوششی اسکوآموس : این بافت که از یک لایه سلول استوانه ای شکل بلند با سیتوپلاسم روشن حاوی موسین تشکیل شده سطح اندوسرویکس را می پوشاند . هسته این سلولها متراکم و در قاعده سلول قرار دارد .

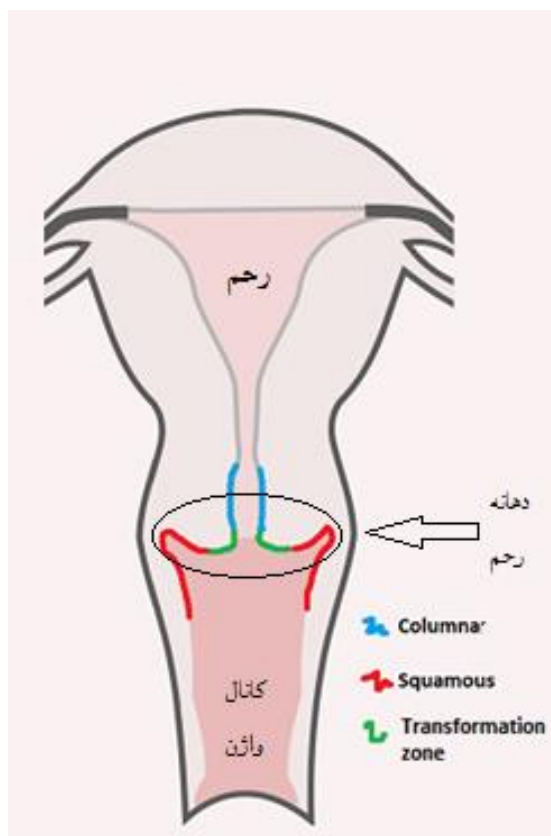
حداصل بین بافت پوششی اسکوآموس و کالمنار در یک محل ثابت نبوده و با سن ، تاثیر استروژن و سابقه جراحی و یا ضربه به سرویکس تغییر می کند. محل اتصال بین این دو بافت پوششی را Transitional zone می گویند . این محل تحت تاثیر پروسه های مختلف فیزیولوژیک یا پاتولوژیک می تواند جابجا گردد و بر اثر آنها اپیتلیوم سنگفرشی بر روی اپیتلیوم کالمنار قرارگیرد و متاپلازی اسکوآموس را باعث گردد T- Zone . ممکن است در قسمت واژینال سرویکس در اطراف سوراخ خارجی یا بالای آن در کانال سرویکال قرار داشته باشد . بنابراین نباید موقعیت قرارگیری T- Zone را مساوی محل آناتومیک سوراخ خارجی دانست . از آنجا که تمام موارد مختلف نئوپلازی اسکوآموس سرویکس از T- Zone منشأ می گیرد، توجه به تغییرات محل قرارگیری این ناحیه در مراحل زندگی اهمیت دارد (۱۵).

با ظهور کولپوسکوپی بسیاری از تغییرات عمده و میکروسکوپی که قبلاً پاتولوژیک تلقی می شدند اکنون به عنوان موارد فیزیولوژیک در نظر گرفته می شود . مهمتر از همه رشد پوشش سرویکال به سوی بخش آناتومیکی می باشد که معتقد بودند پرولاپس مخاطی است (۱۶).

¹ epithelium

² squamous

³ columnar



تصویر ۱-۹ تصویر شماتیک آناتومی و بافت شناسی دهانه رحم

۱-۸-۳ اپیدمیولوژی سرطان دهانه رحم:

بر اساس آمار سال ۲۰۰۸ سازمان جهانی بهداشت، ۵۲۹۸۰۰ مورد جدید سرطان سرویکس و ۲۷۵۱۰۰ مورد مرگ در اثر این سرطان در سراسر جهان گزارش شده است. به عبارت دیگر ۹٪ کل سرطان ها و ۸٪ مرگ ناشی از سرطان به دلیل سرطان سرویکس بوده است که ۸۶٪ این مرگ ها در کشورهای در حال توسعه رخ داده است (۱۷).

در طی ۵۰ سال اخیر به دلیل غربالگری ملی، شیوع این سرطان به میزان ۷۵٪ در کشورهای پیشرفته کاهش نشان داده که با استفاده از واکسن علیه ویروس پاپیلومای انسانی در آینده این کاهش چشمگیرتر خواهد بود. به دلیل همین غربالگری وسیع و ملی در حال حاضر سرطان سرویکس در کشورهای پیشرفته دهمین سرطان در میان بانوان است در حالی که در کشورهای در حال توسعه که غربالگری ملی وجود ندارد یا ناقص انجام می شود این سرطان دومین سرطان شایع در بین بانوان است (۱۸).

شیوع این سرطان بیش از همه در افریقا و امریکای مرکزی می باشد. در امریکا در سال ۲۰۱۱ تعداد ۲۷۱۰ مورد جدید و ۴۲۹۰ مرگ گزارش شده که در بین سرطان های ژنیکولوژی^۱ بعد از سرطان رحم و تخمدان سومین سرطان می باشد. احتمال ابتلا به سرطان سرویکس در طول زندگی یک خانم در کشورهای پیشرفته ۰/۹٪ و مرگ ۰/۳٪ است، در حالی که در کشورهای در حال توسعه این آمار به ترتیب ۱/۹٪ و ۱/۱٪ می باشد. در ایران بر اساس آخرین آمار رسمی این سرطان در بین زنان سیزدهمین جایگاه را دارد اما آمار های محدود تر طی سال های اخیر آنرا دومین سرطان در بین زنان ایرانی معرفی می کند (۱۷).

۱-۸-۴ عوامل خطر ساز سرطان دهانه رحم

۱- شروع ارتباط جنسی در سنین پایین

۲- تعدد شرکای جنس زن

۳- تعدد شرکای جنسی شوهر

۴- استعمال سیگار

¹ gynecology

۵ ویروس HPV

۶- ضعف سیستم ایمنی

۷- زایمان های مکرر

۸- ابتلای مکرر به بیماریهای مقاربتی

۹- قرارگرفتن در معرض دی اتیل بسترول^۱

۱۰ - تاریخچه نئوپلازی داخل اپیتلیالی^۲

۱۱ - ابتلای همسر به سرطان آلت^۳

۱۲ - ابتلای زن دیگر همسر به سرطان سرویکس

۱۳ - وضعیت ضعیف بهداشتی فرد

۱۴ - مصرف قرصهای خوراکی پیشگیری از بارداری بیش از ۵ سال (۱۸, ۱۹).

۱-۸-۵ علائم ابتلا به سرطان دهانه رحم

در مراحل اولیه سرطان گردن رحم، معمولاً هیچ علائمی بروز نمی کند. هنگامی که سرطان بزرگتر می شود، امکان دارد زنان یک یا چند مورد از علائم زیر را مشاهده نمایند:

- خونریزی غیرطبیعی مهبل

¹ diethylstilboestrol

² CIN

³ Penil cancer

- خونریزی که بین دوره‌های منظم قاعدگی صورت می‌گیرد.
- خونریزی پس از آمیزش جنسی، در طول دوش مهبل، یا به هنگام معاینه لگن^۱
- دوره‌های قاعدگی که طولانی‌تر از دوره‌های قاعدگی قبلی بوده و با خونریزی بیش‌تری همراه است
- خونریزی پس از یائسگی^۲
- افزایش ترشحات مهبل
- درد در ناحیه لگن
- درد در طول آمیزش جنسی

توده یا تومور در سرویکس می‌تواند خوش خیم یا بدخیم باشد توده‌های خوش خیم مانند پولیپ، کیست وزگیل‌های ناحیه تناسلی معمولاً خطرناک نیستند و به سایر بافت‌های اطراف تهاجم پیدانمی‌کنند اما تومورها ها یا توده‌های بدخیم مثل سرطان سرویکس می‌توانند به بافت‌ها و اعضای اطراف تهاجم پیدا کنند و سپس به سایر نقاط بدن منتشر شود و تهدیدکننده زندگی باشند سرطان دهانه رحم در سلول‌های سطحی شروع می‌شود در طی زمان سرطان به سلول‌های عمقی و بافت‌های اطراف تهاجم پیدامی‌کند. سلول‌های سرطان دهانه رحم از تومور اولیه جدا شده و از طریق عروق لنفاوی به غدد لنفاوی اطراف انتشار می‌یابند همچنین سلول‌های سرطانی می‌توانند از طریق عروق خونی به ریه‌ها، کبد و استخوانها منتشر شود. بعد از انتشار سلول‌های سرطانی ممکن است به بافت‌های دیگر چسبیده، رشد کرده و تشکیل تومورهای جدید بدهند که سبب آسیب به آن بافت‌ها می‌شود (۱۶، ۱۸).

¹ Pelvic Exam

² Menopause

۱-۸-۶ مرحله بندی^۱ سرطان دهانه رحم

سرطان گردن رحم در سلول‌های واقع در سطح یا رویه گردن رحم آغاز می‌شود. به مرور زمان، امکان دارد سرطان گردن رحم به قسمت‌های عمقی‌تر گردن رحم و به بافت‌های مجاور حمله کند. سلول‌های سرطانی می‌توانند از طریق جدا شدن از تومور اصلی (اولیه) گسترش یابند. این سلول‌های سرطانی وارد رگ‌های خونی یا غدد لنفاوی (Lymph Nodes) می‌شوند که در تمام بافت‌های بدن شاخه شاخه یا منشعب شده‌اند. امکان دارد سلول‌های سرطانی خود را به بافت‌های دیگر متصل کنند و رشد نمایند و تومورهای جدیدی تشکیل دهند، که احتمال دارد این تومورهای جدید به این بافت‌ها صدمه بزنند. گسترش یافتن سرطان را متاستاز می‌نامند. اگر از نتایج بیوپسی مشخص شود که شخص دچار سرطان است، پزشک باید میزان (مرحله) بیماری را بداند تا به بیمار کمک کند بهترین درمان را انتخاب نماید. مرحله بندی تلاشی دقیق برای پی بردن به این نکته است که آیا تومور به بافت‌های مجاور حمله نموده، و اینکه آیا سرطان گسترش یافته، و اگر گسترش پیدا کرده در کدام اندام از بدن این اتفاق رخ داده است. سرطان گردن رحم در اکثر موارد در بافت‌های مجاور که در لگن قرار دارند، در غدد لنفاوی، یا در ریه‌ها گسترش می‌یابد، و امکان دارد به کبد یا استخوان‌ها هم گسترش یابد. اگر سرطان از مکان اصلی خود به بخش دیگری از بدن گسترش یابد، تومور جدید دارای همان نوع سلول‌های تومور اصلی می‌باشد و از همان اسم تومور اصلی برخوردار خواهد بود. به‌عنوان مثال، اگر سرطان گردن رحم به ریه‌ها گسترش یابد، سلول‌های سرطانی موجود در ریه‌ها درواقع سلول‌های سرطان گردن رحم هستند، و بیماری ایجاد

¹ staging

شده سرطان ریه نبوده بلکه سرطان متاستازی گردن رحم می‌باشد، و به این دلیل است که به‌عنوان سرطان گردن رحم به‌حساب می‌آید نه به‌عنوان سرطان ریه.

پزشک لگن شخص مربوطه را معاینه می‌کند، بدن او را لمس می‌کند تا متوجه غدد لنفاوی متورم بشود، و شاید بافت‌های بیش‌تری را از بدن او بردارد.^۱ ممکن است پزشک دستور دهد برخی از تست‌های زیر انجام شود تا او بتواند به میزان بیماری پی ببرد:

- رادیوگرافی قفسه سینه^۲: در عکس‌برداری با اشعه X، در اغلب موارد مشخص می‌شود که آیا سرطان به ریه‌ها گسترش یافته است.

- سی.تی.اسکن^۳: در سی تی اسکن دستگاه اشعه X که به یک کامپیوتر متصل است، یک سری عکس تفصیلی از اندام‌های بدن می‌گیرد. توموری که در کبد، ریه‌ها، یا جای دیگری از بدن وجود داشته باشد، در سی.تی.اسکن مشخص می‌شود. امکان دارد در دست یا بازوی شخصی که تست بر روی او انجام می‌شود یک ماده حاجب تزریق کنند، از او بخواهند این ماده را بلع کند، یا آن را به او تنقیه کنند^۴. ماده حاجب باعث می‌شود نواحی غیرطبیعی راحت‌تر دیده شود.

- ام.آر.آی^۵: برای گرفتن عکس‌های تفصیلی استفاده می‌شود. پزشک می‌تواند این عکس‌ها را روی نمایشگر ببیند، و می‌تواند آنها را روی فیلم چاپ کند. در MRI مشخص می‌شود که آیا سرطان گسترش یافته است. گاهی اوقات کاربرد ماده حاجب باعث می‌شود نواحی غیرطبیعی در عکس‌ها واضح‌تر باشند.

¹ biopsy

² Chest X-Rays

³ CT Scan

⁴ Enema

⁵ MRI

- اسکن پت^۱: به شخصی که تست می‌شود مقدار اندکی قند رادیواکتیو تزریق می‌کنند. یک دستگاه از مصرف شدن این قند توسط سلول‌های بدن تصاویری کامپیوتری تهیه می‌کند. سلول‌های سرطانی این قند را سریع‌تر از سلول‌های نرمال مصرف می‌کنند، و نواحی سرطانی در این عکس‌ها درخشان‌تر به نظر می‌آید (۲۰، ۲۱).

مرحله سرطان به محل پیداشدن آن بستگی دارد. مراحل سرطان مهاجم دهانه رحم به شرح زیر است:

- مرحله صفر یا سرطان درجا^۲: در این مرحله سلول‌های سرطانی هنوز در بافت اولیه و سحی خود سرویکس قرار دارند و هنوز به قسمت‌های دیگر گسترش پیدا نکرده‌اند.
- مرحله ۱: تومور به گردن رحم در زیر لایه بالایی سلول‌ها حمله کرده است. سلول‌های سرطانی تنها در گردن رحم پیدا می‌شوند که خود شامل ۲ زیر مرحله است:

مرحله 1-A: تومور حداکثر با عمق ۵ میلی‌متر و پهنای حداکثر ۷ میلی‌متر و تنها با میکروسکوپ قابل مشاهده است

مرحله 1-B: تومور با عمق بیشتر از ۵ میلی‌متر و پهنای بیشتر از ۷ میلی‌متر و بدون میکروسکوپ نیز قابل مشاهده است

¹ PET Scan

² Carcinoma in situ

- مرحله ۲: تومور به قسمت بالایی مهبل^۱ رسیده است و ممکن است به فراتر از گردن رحم در داخل

بافت‌های مجاور به سمت دیواره لگن یا جدار یا آستر قسمتی از بدن که بین قسمت‌های بالایی ران‌ها

قرار دارد (هم گسترش یافته باشد. تومور به یک سوم پایینی مهبل یا دیواره لگن حمله نکرده است.

مرحله 2-A: سلول‌های سرطانی به دو سوم فوقانی واژن سرایت کرده ولی به اطراف رحم نرسیده اند.

مرحله 2-B: سلول‌های سرطانی علاوه بر دو سوم فوقانی واژن به بافت‌های اطراف رحم نیز سرایت کرده اند.

- مرحله ۳: تومور به قسمت پایینی مهبل رسیده است و ممکن است به دیواره لگن هم حمله کرده باشد.

همچنین تومور ممکن است تا نزدیک گره‌های لنفاوی نیز پیش رفته باشد. اگر تومور جریان ادرار را

مسدود کند، امکان دارد یک یا هر دو کلیه خوب کار نکنند.

مرحله 3-A: تومور یک سوم پایینی رحم را نیز درگیر کرده است

مرحله 3-B: تومور حالب^۲ را درگیر کرده و در اثر انسداد ممکن است کلیه‌ها تحت فشار قرار بگیرند

- مرحله چهارم: تومور به مثانه یا راست روده^۳ حمله می‌کند، یا اینکه سرطان به دیگر قسمت‌های بدن

گسترش یافته است.

¹ vagin

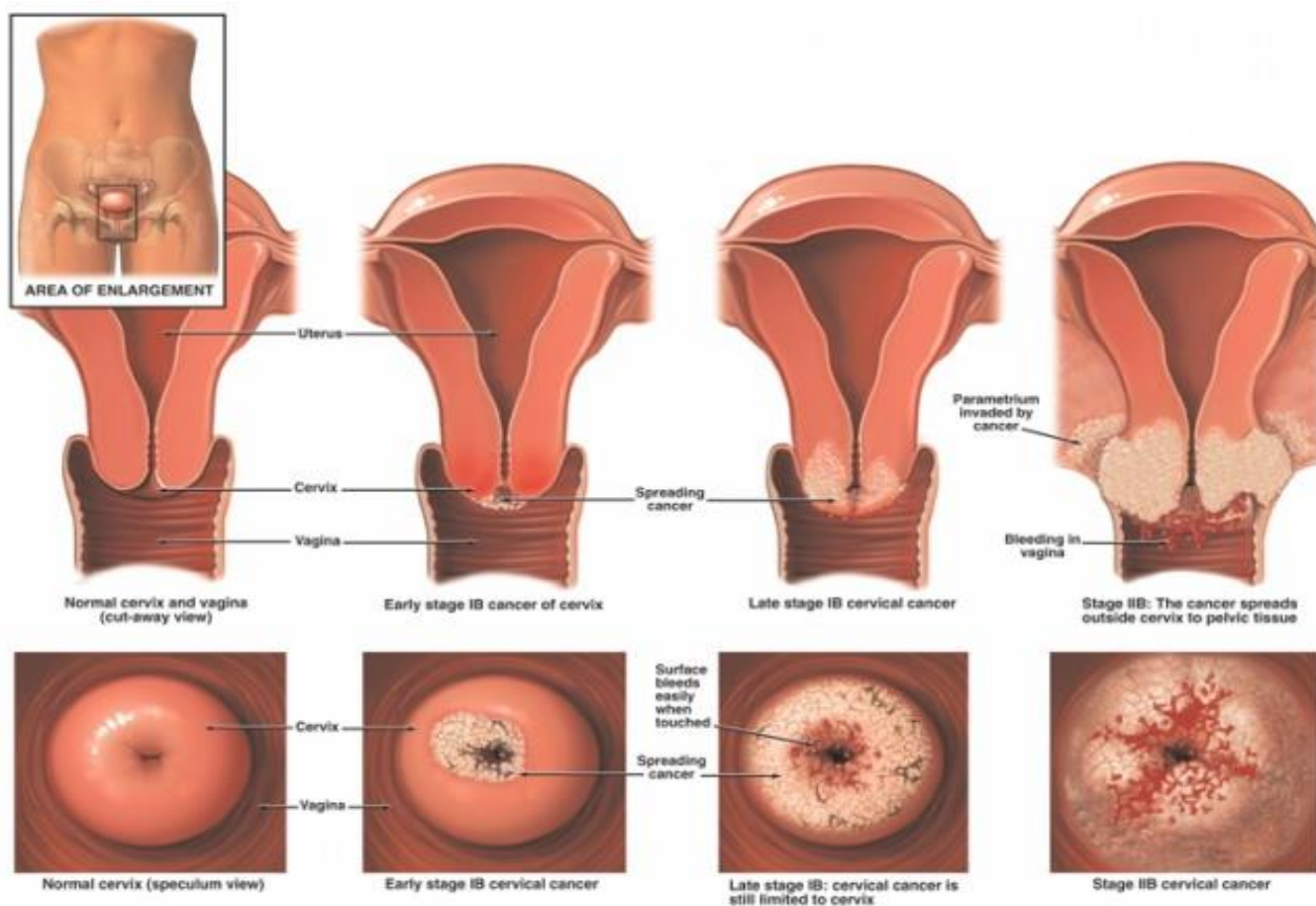
² میزنای

³ rectum

مرحله 4-A: متاستاز به روده بزرگ رکتوم و گره های لنفاوی داخل لگن و درگیر کردن سایر ارگانها از جمله

ریه و کبد

- سرطان عود کننده^۱: سرطانی که درمان شده ولی پس از مدتی، که در طول آن ردیابی نمی شد، برگشته است. ممکن است این برگشت درگرددن رحم یا در دیگر قسمت های بدن صورت گیرد (۲۱).



تصویر ۱-۱۰ تصویر شماتیک از مرحله بندی پیشرفت سرطان دهانه رحم

¹ Recurrent Cancer

۱-۸-۷ مکانیسم ایجاد سرطان دهانه رحم:

HPV با تغییر پروتئانکوژن و تومور ساپرسور ژن ها، باعث ایجاد تغییر شکل سلول شده و ایجاد سرطان می شود. انکوژن ها، فعال کننده های پروتئانکوژن های سلولی هستند. این ژن ها، کد کننده پروتئین هایی هستند که مستقیماً در تنظیم رشد و تکثیر سلولی دخالت دارند. انکوژن ها یا از موتاسیون پروتئانکوژن ها و یا از بیان غیر نرمال آن ها حاصل می شوند، در نتیجه ی این تغییرات، انکوژن ها، باعث تکثیر غیرنرمال سلول ها و توسعه تومور می شوند. انکوژن های ویروسی و سلولی یک گروه بزرگ از ژن ها هستند که در غیر نرمال نمودن و یا بدخیمی سلول ها شرکت دارند. تومور ساپرسور ژن ها، گروهی از ژن هایی هستند که نقش مهمی در تنظیم زمان تقسیم سلول ها و افزایش تعداد آن ها ایفا می کنند. از جمله ی این پروتئین ها می توان به رتینوبلاستوما (Rb) و P53 اشاره کرد. انکوپروتئین های E6 و E7 با اختلال در عملکرد این پروتئین های سلولی باعث تکثیر غیر طبیعی سلول ها می شوند. عفونت اولیه با HPV 16 منجر به بیماری خفیف تری می شود که در آن DNA ویروسی، در فرم اپی زومال در هسته سلول وجود دارد (۱۲، ۲۲).

در اکثر سرطان های وابسته به HPV، DNA ویروسی به صورت تصادفی شکسته و به فرم خطی تغییر شکل پیدا می کند و در داخل ژنوم میزبان ادغام می شود. ظاهراً جایگاه ورود ژنوم ویروسی به درون ژنوم سلول میزبان، اختصاصی نیست و گاهی اوقات ورود ژنوم، در غیاب انکوژن های سلولی رخ می دهد. گفته شده است که ورود DNA ویروسی، به داخل DNA میزبان یک رویداد مهم در گسترش سرطان سرویکس می باشد که این امر اغلب از طریق شکسته شدن ژنوم از ناحیه E2 اتفاق می افتد. ادغام شدن نه تنها به انکوپروتئین های E6

و E7 اجازه بیان شدن می دهد بلکه به علت از دست رفتن خاصیت تنظیمی ژن E2 باعث افزایش بیان آن ها می شود (۸).

۸-۸-۱ ردیابی و تشخیص سرطان دهانه رحم

اولین خط برای غربالگری یا شناسایی مشکلات دهانه رحم انجام آزمایش پاپ اسمیر^۱ می باشد، تست پاپ برای اکثر زنان دردناک نیست و در مطب پزشک یا کلینیک در طول معاینه لگن انجام می شود. پزشک یا پرستار با خراش دادن گردن رحم از سلول های آن نمونه برداری می نمایند. در آزمایشگاه این سلول ها را زیر میکروسکوپ بررسی می کنند (سایتولوژی).

در صورتی که هرگونه تغییر غیرعادی سلولی در نمونه مشاهده شود که نشانه آلودگی با ویروس HPV باشد یا نشانه ای از تغییرات یا تکثیر غیر عادی سلول ها باشد بر روی همین نمونه سلولی می توان تست عفونت HPV را انجام داد (۲۱).

اگر نتایج تست پاپ یا HPV غیرطبیعی باشد، برای بررسی های بیشتر مراحل زیر انجام می شود:

- ۱- کولپوسکوپی^۲ یا آندوسکوپی رحم : برای نگاه کردن به گردن رحم از کولپوسکوپ یا آندوسکوپ رحم استفاده می کنند. کولپوسکوپ وارد رحم نمی شود بلکه از خارج رحم به داخل نگاه می کنند. برای آنکه دیدن بافت ها در کولپوسکوپ آسان تر باشد، این وسیله به نور شدید و ذره بین مجهز شده است.

¹ Pap smear

² Colposcopy

۲- بیوپسی یا نمونه برداری : در این تست، در مورد اکثر زنان، بافت برداری با بی حسی موضعی در مطب پزشک انجام می شود. پاتولوژیست بافت را زیر میکروسکوپ واری می کند تا متوجه حضور سلول های غیرطبیعی بشود.

انواع بیوپسی به شرح زیر است:

الف - بیوپسی یا نمونه برداری با پانچ (Punch Biopsy) از وسیله ای تیز برای کندن نمونه های کوچکی از بافت گردن رحم استفاده می شود

ب- LEEP^۱: از حلقه ای از سیم برق برای قطع کردن یک تکه نازک دایره ای شکل از بافت گردن رحم استفاده می شود.

ج- کورتاژ قسمت داخلی گردن رحم^۲: از یک قاشق یا کورت^۳ (Curette) برای خراش دادن گردن رحم و برداشتن نمونه ای از بافت آن استفاده می شود. ممکن است برخی از پزشکان به جای کورت از یک برس نازک و نرم استفاده کنند.

د- مخروط برداری^۴: پزشک نمونه ای مخروطی شکل از بافت گردن رحم برمی دارد. یا بیوپسی مخروطی، به آسیب شناس امکان می دهد ببیند که آیا سلول های غیرطبیعی در بافت زیر سطح گردن رحم وجود دارد. امکان دارد پزشک این تست را در بیمارستان با بی حسی یا بیهوشی عمومی انجام دهد (۲۰، ۲۳).

^۱ Loop Electrosurgical Excision Procedure

^۲ Endocervical Curettage

^۳ وسیله ای کوچک به شکل قاشق

^۴ Conization

۱-۸-۹ پیش آگهی سرطان دهانه رحم:

در تعیین پیش آگهی سرطان دهانه رحم فاکتورهایی از جمله : سن، حال عمومی و وضعیت اجتماعی اقتصادی بیمار، نمای ظاهری کانسر ونمای سیتولوژیک و ویژگی های هستیولوژیک کانسر، مهارت و تجربه پزشک در طبقه بندی بالینی و درمان کانسر را باید در نظر داشت .سن بیمار از این جهت حائز اهمیت است که تومورهای مهاجم تر معمولاً در زنان جوان و تومورهای با رشد آهسته در زنان مسن بیشتر یافت می شوند .اگر سرطان دهانه رحم درمان نشود یا به درمان پاسخ ندهد در ۹۵ درصد موارد در عرض ۲ سال بعد از شروع علائم منجر به مرگ می شود(۱۹).

۱-۸-۱۰ درمان سرطان دهانه رحم:

بسته به مراحل مختلفی که بیمار در آن قرار داشته باشد، حمله سرطان به سایر بافت ها یا در محل ماندن آن و سایر عوامل استراتژی های مختلف درمانی با ترکیبی از جراحی ،پرتودرمانی ،شیمی درمانی انتخاب می شود(۲۴).

۱-۹ روش های تشخیص و غربالگری سرطان دهانه رحم:

سرطان مهاجم دهانه رحم به عنوان یک سرطان قابل پیشگیری در نظر گرفته می شود، زیرا این سرطان دارای یک دوره طولانی پیش از تهاجم است و در این دوره، قابل درمان بوده و میزان بقاء در مرحله پیش تهاجمی حدوداً ۱۰۰ درصد و در زنان مبتلا به سرطان موضعی تا ۹۲ درصد می باشد. درحالی که این درصد برای سرطان مهاجم فقط ۱۰ % است. تاکنون روشهای متعددی جهت تشخیص زودرس سرطان دهانه رحم و پیشگیری ثانویه آن ارائه شده است که از جمله آن ها می توان به روش های سایتولوژی و هیستولوژی مانند پاپ اسمیر و بیوپسی دهانه رحم و روش های مولوکولی از جمله شناسایی HPV و ژنوتایپینگ آن در نمونه های دهانه رحم و همچنین روش های مدرن مانند استفاده از بیومارکر های ویروسی (مثل E6 و E7) و میزبانی (مثل P14ARF و P16INK4a) اشاره کرد (۲۵).

۱-۹-۱ پاپ اسمیر^۱:

پاپ اسمیر یک روش غربالگری ساده، ارزان، بدون درد و نسبتاً قابل اعتماد جهت تشخیص عفونت و سرطان دهانه رحم و جستجوی تغییرات پیش سرطانی در بیماران می باشد، به عبارت دیگر ارزان ترین و در دسترس ترین آزمون برای خط اول غربالگری و تشخیص سرطان دهانه رحم پاپ اسمیر می باشد. باتوجه به اینکه تغییرات پیش رونده به سرطان در دهانه رحم معمولاً هیچگونه علامت بالینی ندارد. تشخیص آن غالباً از روی

¹ PAP smear

یافته های سیتولوژیک در آزمایش پاپ اسمیر داده می شود. از آنجا که دیسپلازی در پاتولوژی سرطان گردن رحم یک مرحله گذرا میباشد. لذا تشخیص فوری آن از اهمیت بالایی برخوردار است. باید هرچه زودتر در مراحل اولیه که پاسخ خوبی به درمان می دهد آن را شناخت و درمان را آغاز کرد (۱۶).

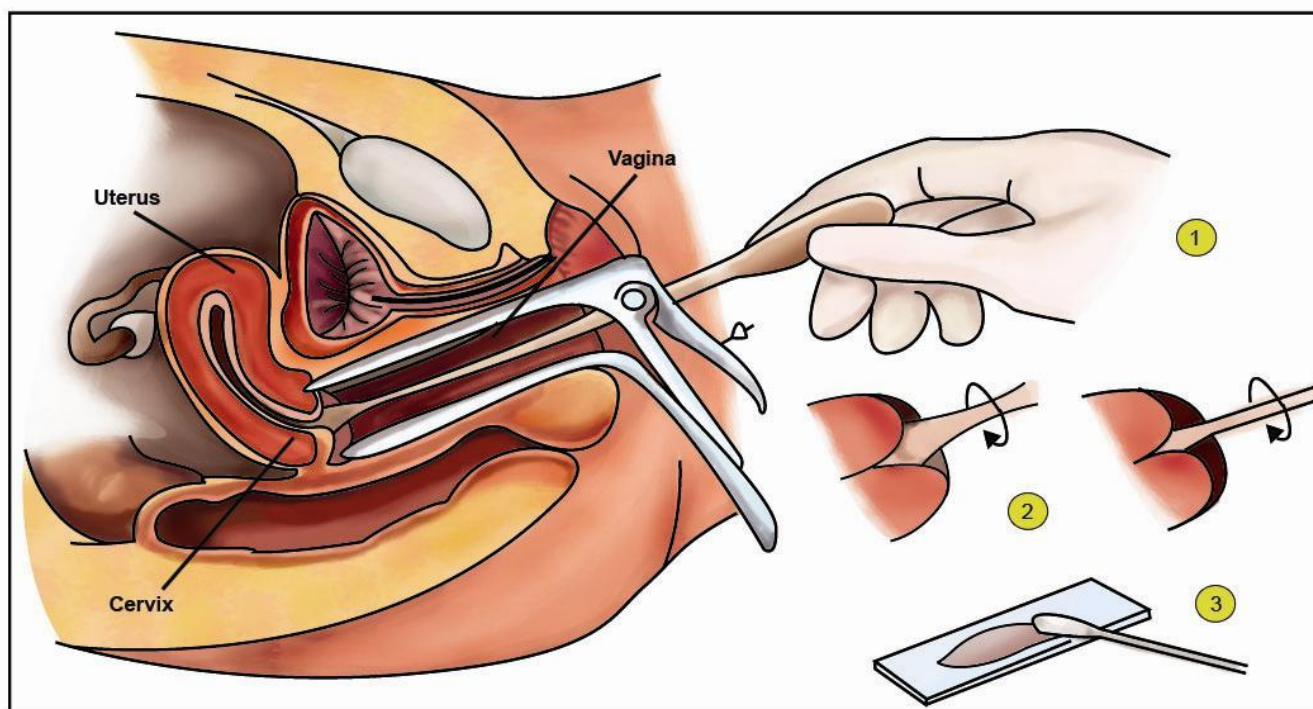
ایده آل آن است که بیماری در مرحله بدون علامت بوسیله پاپ اسمیر تشخیص داده شود. پنجاه سال پیش سرطان دهانه رحم مهمترین علت مرگ برادر بیماریهایی بدخیم در خانم های آمریکایی بود اما این مرگ و میر در سال ۱۹۶۰ به حدود نصف کاهش یافت و تا امروز این روند کاهش ادامه دارد. بخش عمده کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان دهانه رحم در زنان نتیجه غربالگری موثر پاپ اسمیر میباشد و بخش دیگر از این موفقیت مدیون بهبود شیوه های درمان است که باعث افزایش امید به زندگی گردیده است. آخرین توصیه ها برای غربالگری مناسب سرطان دهانه رحم انجام پاپ اسمیر از شروع فعالیت جنسی تا ۶۵ سالگی است این تست باید بطور سالانه در سه سال متوالی انجام شود و پس از کسب سه نتیجه منفی متوالی هر ۳ سال آزمایش تکرار گردد. در حال حاضر نگرانی جوامع پزشکی پاسخ های کاذب^۱ این تست می باشد که به عنوان مهمترین نقطه ضعف این شیوه ارزشمند مطرح شده است. برای مطالعه سیتولوژیک مخاط دستگاه تناسلی باید سلول ها را بوسیله ای جمع آوری کرده واز آنها اسمیر تهیه کرد. برای این کار ممکن است سلولهایی که به صورت خودبخودی ریخته شده اند جمع آوری گردند یا سلولها را بوسیله خراش دادن سطحی مخاط بدست آورد ویا هردو روش باهم استفاده شود(۱۶).

بهترین زمان انجام پاپ اسمیر فاز پرولیفراتیو^۲ ترجیحاً روز ۱۵ سیکل قاعدگی است. همچنین اسمیر باید به دقت تهیه شود تا موارد منفی کاذب به حداقل برسد چراکه اسمیری که تنها از جدار واژن ویا از ترشحات بن بست

¹ False positive or negative reports

² Proliferative phase

خلفی تهیه گردد و فاقد سلولهای آندوسرویکس باشد ارزش صدصد برای رد کردن کانسر گردن رحم را ندارد بنابراین تنها آن دسته از پاپ اسمیرهایی ارزش تشخیصی دارند که شامل ترشحات آندوسرویکس نیز باشند و سلول های این ناحیه را بتوان در آنها دید (۱۶).



تصویر ۱-۱۱ شکل شماتیک از محل و روش صحیح گرفتن نمونه برای بررسی به روش پاپ اسمیر

قبل از انجام پاپ اسمیر به چند نکته باید توجه شود:

الف: مراجعه کننده در طی ۲۴ ساعت قبل مقاربت نداشته باشد.

ب: از یک هفته قبل کرم واژینال استفاده نکرده باشد.

ج: از ۴۸ ساعت قبل از دوش واژینال^۱ استفاده نکرده باشد.

د: قبل از انجام پاپ اسمیر به هیچ عنوان معاینه واژینال صورت نگرفته باشد.

ه: از ۲۴ ساعت قبل خونریزی یا لکه بینی نداشته باشد (۱۶).

۱-۹-۱-۱ نقایص پاپ اسمیر:

با وجود اینکه پاپ اسمیر به لحاظ هزینه و سادگی انجام و در دسترس بودن دارای مزایای فراوانی می باشد تا آنجا که امروزه به خط اول برای غربالگری و تشخیص ناهنجاری های دهانه رحم تبدیل شده است اما نقایص و کمبود های فراوانی نیز برای آن قابل ذکر است که میتواند اختلالات جدی در امر تشخیص را سبب شود. نقایص پاپ اسمیر عبارتند از:

۱- کاربرد شیوه های نادرست در تهیه نمونه پاپ اسمیر

۲- وجود سلولهای التهابی در نمونه پاپ اسمیر که به علت خصوصیات غیر طبیعی شان با سلولهای سرطانی قابل افتراق نبوده و تفسیر این تست را مشکل می آند.

۳- میزان پاسخ منفی کاذب در یک آزمایش منفرد پاپ اسمیر در مورد ضایعات داخلی مخاط سنگفرشی درجه بالا^۲ وسیع بوده و حداقل ۲۰-۳۰ درصد می باشد. سهل انگاری در تهیه نمونه در نتیجه عدم کفایت نمونه

¹ vaginal douching

² High grade squamous intraepithelial lesions (HSIL)

سلولی و نیز اشتباه در تفسیر آن از سوی آزمایشگاه دو عامل مهم و بدیهی در بروز موارد پاسخ منفی کاذب می باشد (۲۶).

علل مرگ و میر ناشی از سرطان دهانه رحم در زنان را معلول موارد زیر می دانند:

۱-عدم غربالگری منظم در زنانی که در معرض عوامل خطر زا قرار دارند.

۲-عدم کفایت نمونه سلولی جمع آوری شده یا اشتباه در تفسیر آن می تواند موارد منفی کاذب را به تا ۸۰٪

برساند. حتی در بهترین آزمایشگاه ها حدود یک سوم موارد منفی کاذب به اشتباهات آزمایشگاهی مربوط می شود و مابقی معلول عدم دقت در تهیه نمونه و ناکافی بودن نمونه تهیه شده می باشد (۱۸).

۱-۹-۲ روش ارزیابی کیفیت نمونه ارسالی^۱:

برای درجه بندی شرایط نمونه سه فرم کلی وجود دارد:

۱- رضایت بخش و یا مورد قبول^۲:

سلول های نمونه باید به مقدار کافی باشد حداقل ۱۰ تا ۲۰ درصد سطح لام را نمونه حاوی سلولهای اسکواموس بپوشاند. حداقل ۲ خوشه ی ۵ سلولی سلول اندوسرویکال و یا موکوس سرویکال دیده شود. خون ، عفونت ، مواد خارجی سطح وسیعی از نمونه را نپوشانده باشد.

¹ Adequacy

² Satisfactory

۲- غیر رضایت بخش^۱:

خون ، عفونت ، مواد خارجی سطح وسیعی از نمونه را پوشانده باشد (بیشتر از ۷۰ % نمونه) و یا عدم وجود سلول یا موکوس اندوسرویکال بطوریکه نمونه قابل خواندن نباشد در اینصورت تکرار نمونه گیری لازم است.

۳- زیر حد مطلوب^۲

فیکسیاسیون غلط ، بالا بودن ضخامت نمونه ، مواد خارجی ، وجود خون اتولیز به نحوی که ۵۰ تا ۷۰ درصد نمونه زیر این مواد باشد و قابل بررسی نباشد، تکرار نمونه برداری لزومی ندارد مگر اینکه شک بالینی یا سیتولوژیک قوی به وجود عوامل پاتولوژیک داشته باشیم. همه پاپ اسمیرهای غیرطبیعی را پس از تکرار باید با کولپوسکوپ و ویوپیسی جهت تأیید تشخیص هیستولوژیک مورد ارزیابی قرارداد(۱۶).

۱-۹-۱-۳ سیستم های طبقه بندی پاپ اسمیر :

۱-۹-۱-۳-۱ سیستم دیسپلازی^۳

سلول های متاپلاستیک معمولاً "به سلولهای رسیده اپی تلیومی مبدل می شوند ولی در بعضی موارد این سلولها دچار آتیپی (تغییرات قبل از مرحله دیس پلازی و سرطان گردن رحم) می شوند تغییرات غیر طبیعی در یک کانون منفرد و یادر چند کانون اتفاق می افتد در بعضی از زنان تغییرات دیس پلاستیک به طور فزاینده ای شدت

¹ Unsatisfactory

² Less than optimal

³ CIN

گرفته و سلول ها خصوصیات بدخیمی بیشتری پیدا می کنند . از آنجا که پیشرفت یا پسرفت دیس پلازی قابل پیش بینی نمی باشد لذا به عنوان مرحله قبل از سرطان در نظر گرفته شده و به آن نئوپلازی داخل اپی تلیومی گردن رحمی (CIN¹) گفته می شود . در دیس پلازی خفیف (CIN1) یک سوم تحتانی لایه اپی تلیال ، سلول های افتراق نیافته می باشند . در دیس پلازی متوسط (CIN 2) ۵۰ درصد لایه اپی تلیال ، سلول های افتراق نیافته می باشند و در دیس پلازی شدید (CIN3) ۷۰ درصد از ضخامت اپیتلیوم سلول های سلولهای افتراق نیافته می باشد. در کارسینومای درجا (in situ) تمام ضخامت اپی تلیوم سلول های افتراق نیافته می باشد. بیشتر از ضایعات هر مرحله ای از دیس پلازی ممکن است به اپی تلیوم طبیعی پسرفت کند ولی احتمال پسرفت مرحله اول CIN بیشتر می باشد و احتمال تبدیل مراحل پیشرفته تر به سرطان مهاجم بیشتر است . میانگین زمان انتقال از تغییرات خیلی خفیف دیسپلازی به سرطان درجا ۸۵ ماه ، از دیسپلازی خفیف ۵۸ ماه ، از دیسپلازی متوسط ۳۸ ماه و از دیسپلازی شدید ۱۲ ماه گزارش شده است و حد متوسط زمان لازم برای تبدیل سرطان درجا به سرطان مهاجم بین ۱۰ تا ۳۰ سال محاسبه شده است. پیشرفت دیسپلازی به سرطان درجا در ۴۰-۶۰ درصد موارد به اثبات رسیده است و میزان پسرفت خود بخودی در دیسپلازیهای خفیف یا متوسط ۳۰ درصد گزارش شده استدر مطالعه سازمان جهانی بهداشت ذکر شده است که حدود یک سوم از موارد HSIL بدون این که درمان شوند در طی ۱۰ سال به طرف سرطان پیشرفت خواهد کرد و در حدود ۷۰ درصد از موارد LSIL^۲ به صورت خود بخودی پسرفت می کند و یا پیشرفت نمی کند(۲۷, ۲۸).

¹ Cervical Intraepithelial Neoplasia

² Low grade squamous intraepithelial lesions

درمان در سیستم دیسپلازی:

قبل از آغاز درمان باید تشخیص بافتی صحیح وجود داشته باشد و شدت ضایعه مشخص گردد روشهای حذفی گوناگونی برای درمان CIN به کار رفته که عبارتند از جراحی، کرایو^۱ و لیزر. تمام روشهای درمانی با میزان عودی معادل حداکثر ۱۰ درصد همراه هستند و لذا باید هر سه ماه یکبار برای مدت یک سال بیمار را با روشهای سیتولوژیک پیگیری نمود. کرایوتراپی (سرما درمانی) روش بسیار موثری برای درمان CIN می باشد و میزان شکست آن بسیار پایین است. در این روش ایجاد تنگی در سرویکس نادر است و خونریزی پس از درمان غیر شایع می باشد. اگر کرایو به درستی انجام شود تا عمق ۵ الی ۶ میلی متر نکروز ایجاد می کند و تا ۹۹ % غدد مبتلا را نابود می سازد. با وجود اینکه ۳۰ درصد موارد CIN1 به طور خود به خودی درمان می شوند ولی اکثر ضایعات CIN بدون توجه به نوعشان به محض تشخیص درمان می شوند (۲۹).

۱-۹-۱-۳-۲ سیستم Bethesda:

در سال ۱۹۸۹، انستیتوی ملی سرطان سیستم Bethesda را برای گزارش نمونه های سیتولوژیک معرفی نمود این سیستم ضایعات سنگفرشی را که بطور بالقوه پیش بدخیم باشند در طبقات ذیل قرار می دهند:

۱- سلولهای سنگفرشی آتیپیک با اهمیت نامشخص^۲ (ASCUS)

^۱ cryotherapy

^۲ Atypical Squamous Cell OF Undetermined Significance

سلولهای غیرطبیعی که دارای معیارهای مربوط به ضایعات داخلی اپی تلیالی سنگفرشی با درجه پائین یا بالا نیستند. این ضایعات در گذشته تحت عنوان آتی پی^۱ نامیده می شدند . عنوان دارای اهمیت نامشخص برفقدان یک معیار تشخیص یکسان در این سلولها دلالت میکند و در ضمن حاکی از آن است که ارتباط این سلولها با ابتلاء به سرطان سرویکس عفونت HPV و سایر اختلالات نامشخص می باشد . گروه ASCUS تنها محدود به سلولهای غیرطبیعی می شود که واقعاً اهمیت شناخته شده ای ندارد . این گروه دربرگیرنده تغییرات خوش خیم ، واکنشی و ترمیمی نیست زیرا این تغییرات را براساس سیستم Bethesda تحت عنوان طبیعی تلقی می کنند. در صورت نتیجه غیرطبیعی، انجام کولپوسکوپی لازم میباشد که در حین آن نمونه برداری و کورتاژ آندوسرویکال (ECC) انجام می شود.

۲- ضایعات داخل اپی تلیالی سنگفرشی با درجه پائین (LSIL)

۳- ضایعات داخل اپی تلیالی سنگفرشی با درجه بالا (HSIL) (۲۷, ۲۸).

درمان در سیستم bethesda:

درمان در مرحله ASCUS:

روش فعلی برای درمان ASCUS مورد توافق نمی باشد بررسی سیستمولوژی روش مطلوبی برای غربالگری است اما روش موثری برای تعیین سیاستهای درمانی محسوب نمی شود . زیرا نتایج حاصل از آن در ۴۰ درصد از بیمارانی که ضایعه آنها بوسیله کولپوسکوپ مشخص شده منفی است . قبل از اقدام به درمان لازم است که

¹ atipia

متخصص آسیب شناسی و کولپوسکوپیست یافته های حاصل از کولپوسکوپی ، بررسی سیتولوژی و نمونه برداری از سرویکس و کورتاژ آندوسرویکال را مورد بازبینی قرار دهند سرویکوگرافی نیز یکی از روشهای بررسی ثانویه بیمارانی است که نتیجه آزمون پاپ در آنها غیرطبیعی است . سرویکوگرافی^۱ برای تشخیص ضایعات مورد استفاده قرار می گیرد و سپس نتایج حاصل از آن با نتایج کولپوسکوپی و نمونه برداری مقایسه می شود. هرچند که میزان حساسیت روشهای کولپوسکوپی و سرویکوگرافی با یکدیگر مساوی است ولی میزان اختصاصی بودن سرویکوگرافی نسبت به کولپوسکوپی خیلی بیشتر است. آنالیز برنامه غربالگری نشان داده که ۸۴ درصد از ضایعات موجود در خانم های جوانتر از ۳۴ سال و ۴۰ درصد در خانم های مسن تر از ۳۴ سال به طور خودبخودی رفع می شود. به هر حال اگر کولپوسکوپی وجود T-Zone غیرطبیعی را نشان دهد و نمونه برداری CIN را مسجل کند تخریب ناحیه تبدیل غیرطبیعی امری منطقی می باشد(۲۹).

درمان در مرحله LSIL :

LSIL در اغلب نمونه های سیتولوژی روندی را نشان می دهند که بدون درمان به خودی خود به حالت طبیعی تبدیل می شوند در هر حال تعداد کمی از خانم ها مبتلا به ضایعه ای هستند که پیشرفت خواهد کرد. بیماران مبتلا به سیتولوژی LSIL باید حداقل هر ۶ ماه یکبار تحت بررسی سیتولوژی سرویکس قرار گیرند و اگر اختلالی باقی بماند لازم است که کولپوسکوپی انجام گیرد. بخاطر وجود نتایج منفی کاذب در آزمون پاپ معمولاً بهتر است بیمارانی که دارای تشخیص اولیه LSIL هستند تحت کولپوسکوپی قرار گیرند تا احتمال وجود ضایعه مشخص گردد. اگر بعد از حصول تشخیص بافتی کل ضایعه و محدوده ناحیه تبدیل قابل مشاهده باشد می توان ضایعه را

¹ cervicography

خارج کرد و یا بیمار را بدون درمان تحت پیگیری قرارداد. پیگیری و درمان بیماران تا حدود زیادی بستگی به تمایل و پذیرش بیمار دارد. از آنجایی که حدود ۱۵٪ از این ضایعات پیشرفت می کنند خارج کردن ضایعه منطقی بنظر می رسد از طرف دیگر از آنجاکه ۶۰٪ از این ضایعات بطور خودبه خود فروکش می کنند تحت نظر داشتن بیماری در موارد لزوم برای یک بیمار دارای پذیرش مناسب نیز روش مناسبی محسوب می شود (۱۶).

درمان در مرحله HSIL :

تمام خانمهایی که نمونه سیتولوژی آنها به نفع وجود HSIL دیس پلازی متوسط یا شدید (CIN 2 و CIN 3) است باید تحت بیوپسی با هدایت کولپوسکوپی قرار گیرند. بدنبال نمونه برداری با هدایت کولپوسکوپی باید درمان حذفی انجام گیرد. همانطور که اشاره شد کرایوتراپی (سرما درمانی) روش بسیار موثری برای درمان می باشد و میزان شکست آن بسیار پائین است. در این روش ایجاد تنگی در سرویکس نادر است و خونریزی پس از درمان غیر شایع می باشد. اگر کرایو به درستی انجام شود تا عمق ۵ الی ۶ میلی متر نکروز ایجاد می کند و تا ۹۹٪ غدد مبتلا را نابود می سازد (۲۹).

کرایوتراپی در موارد زیر انجام میشود:

۱- نئوپلازی داخل اپیتلیالی سرویکس درجه ۱ تا ۲

۲- کوچک بودن ضایعه

۳- قرارداد داشتن ضایعه در محل اکتوسرویکس^۱

¹ ectocervix

۴- منفی بودن نتیجه کورتاژ اندوسرویکال

۵- فقدان درگیری غدد اندوسرویکال در نمونه برداری (۱۶).

۱-۹-۲ تست HPV DNA:

همانگونه که پیش تر اشاره شد امروزه نقش آلودگی با ویروس پاپیلومای انسانی در ابتلا به سرطان دهانه رحم و شکل گیری مراحل پیش سرطانی آن اثبات شده است به خصوص تیپ های پر خطر این ویروس و به وضوح تیپ های ۱۶ و ۱۸. بنابر این انجام آزمایشی برای تایید آلودگی با این ویروس برای نشان دادن احتمال پیشرفت به سمت سرطان دهانه رحم منطقی به نظر می رسد. سالهاست روش های گوناگونی برای شناسایی آلودگی های ویروسی پاپیلومایی در نمونه های سرویکس در آزمایشگاه ها استفاده می شود و در این راه از روش های مولکولی زیادی کمک گرفته شده است. این روند با ابداع و انجام روش های دست ساز^۱ پژوهشگران آغاز شد و تا آنجا پیش رفت که امروزه کیت های تشخیصی HPV با اساس های آزمایشی گوناگون از جمله PCR ، DNA probes و .. در دسترس هستند. اگرچه در مورد انجام عمل تشخیص HPV، در غربال گری های اولیه سرطان دهانه رحم هنوز بحث هایی وجود دارد، لیکن امروزه الگوریتم ها و برنامه های جدیدی مبتنی بر غربال گری اولیه این ویروس آغاز شده و به اجرا درآمده است، چرا که آزمایش معمول و قدیمی پاپ اسمیر علاوه بر محدودیت های متعدد، از لحاظ حساسیت تشخیصی نیز نسبت به روش تشخیص مولکولی HPV از جایگاه پایین تری برخوردار است (۲۶، ۳۰).

¹ In house method

تست های متداول تشخیصی HPV بر ردیابی DNA طیف وسیعی از انواع تیپ های HPV در یک آزمایش منفرد متکی هستند. همانگونه که اشاره شد روش های متعددی برای نیل به این هدف توسعه یافته اند که از آن جمله می توان به روش های PCR مبتنی بر توالی های حفظ شده^۱ اشاره نمود. اما اگرچه کیت های تشخیصی از دقت و صحت بالاتری برخوردار هستند اما با توجه به مراجعه اندک نسبت به هزینه صرف شده برای تهیه کیت ها ممکن است استفاده از آنها برای آزمایشگاه های کوچک توجیه اقتصادی نداشته باشد، لذا روش نسبتاً ساده و اقتصادی جهت اختصاصی PCR که امروزه در تمام آزمایشگاه ها موجود است می تواند یکی از بهترین روش ها برای شناسایی HPV در نمونه های سرویکس باشد (۳۱).

از آن جا که با استفاده از روش های سرولوژیک و کشت سلولی، امکان تشخیص این ویروس و انواع آن وجود ندارد، در تشخیص دقیق، قطعی و زودهنگام این ویروس، روش های مولکولی از جمله PCR از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند و مطالعات مروفولوژیک نیز حتی با اعمال تکنیک های نوین مانند فاز مایع^۲ با وجود پیشرفت های بسیار زیاد هنوز به تنهایی حساسیت کافی را دارا نمی باشند. همچنین قابلیت پیش گویی این تست در مورد اینکه آیا با توجه به حضور یا عدم حضور ویروس HPV روند پیشرفت به سمت سرطان به چه شکل خواهد بود از مزایای اصلی این تست می باشد. از آنجا که این ویروس دارای ژنوتایپ های گوناگونی می باشد در این آزمایش ها توجه به این نکته که شناسایی تمام ژنوتایپ ها مورد توجه باشد نکته اساسی می باشد. توالی های حفظ شده گوناگونی از ژنوم ویروس پاپیلوما برای تهیه و ساخت پرایمر برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفته است، البته بیشترین تمرکز بر روی سکانس L1 ژنوم و سکانس E7 ژنوم بوده است. پرایمر هایی که بیشتر

¹ Conserved sequences

² Liquid – Base

در مقالات مورد توجه بوده اند و سازمان بهداشت جهانی نیز استفاده از آنها را توصیه می کند پرایمر های GP5/6+ و مجموعه پرایمر PGMY می باشد (۲۶, ۲۷, ۳۰).

۱-۹-۲-۱ کاربردهای تست HPV DNA :

در حال حاضر در ۴ مورد از تست HPV استفاده می شود که عبارتند از:

- ۱- تریاژ خانم هایی که با سیتولوژی مشکوک ASCUS یا LSIL می باشند .
- ۲- پی گیری خانم هایی که با نتایج غربالگری غیرطبیعی بوده ولی دارای کولپوسکوپی یا بیوپسی منفی می باشند.
- ۳- پی گیری افرادی که تحت درمان CIN واقع شده اند
- ۴- به عنوان غربالگری کانسر سرویکس به تنهایی یا برای ارزیابی ضایعات پیش سرطانی همراه با پاپ اسمیر سرویکس (۲۰).

۱-۹-۲-۲ محدودیت های استفاده از تست HPV DNA :

با وجود مزایایی که برای تست HPV همراه با سیتولوژی موجود است، در صورتی که این تست به درستی مورد استفاده واقع نشود دارای اثرات منفی بسیار بوده چرا که عفونت با HPV شایع است و تعداد زیادی از افراد از نظر HPV-DNA مثبت می باشند ولی تعداد اندکی از افراد دچار کانسر سرویکس می شوند. برای

برقراری تعادل بین افزایش حساسیت تست HPV و ارجاع بیشتر به کولپوسکوپی و بالا بودن اختصاصیت^۱ پاپ اسمیر را ه هایی پیشنهاد شده که از جمله آن ها عبارت از این است از اینکه انجام این دو تست در گروه سنی بیشتر از ۳۰ سال اندیکاسیون داشته و در زنانی که تست HPV و سیتولوژی بعد از این سن منفی باشد نیازی به تکرار تست تا سه سال آینده نیست. به عبارتی راه پیشنهادی دیگر این است که فواصل تست طولانی شود. راه دیگر این است که با افرادی که از نظر HPV مثبت ولی از نظر سیتولوژی منفی می باشند به طور کنسرواتیو^۲ برخورد شود به این صورت که این افراد تحت تست HPV و سیتولوژی مجددا در عرض شش تا ۱۲ ماه واقع شده و در صورت غیرطبیعی بودن یکی از تست ها کولپوسکوپی انجام شود و در غیر این صورت وارد برنامه غربالگری^۳ سه ساله بشوند و بالاخره این که از تست HPV به تنهایی استفاده شده و در صورتی که مثبت باشد از تست سیتولوژی به عنوان تست تریاژ به دنبال تست HPV مثبت استفاده شود (۳۲).

۱-۹-۳ تست HPV DNA Typing:

علاوه بر تست هایی که به منظور تشخیص آلودگی سرویکس با ویروس پاپیلوما انجام می شود آزمایشات دیگری نیز به منظور شناسایی ژنوتایپ (یا ژنوتایپ های) آلوده کننده انجام می شود، چرا که همانگونه که پیشتر ذکر گردید برای پیشرفت ضایعات به سمت سرطان اینکه آلودگی با ویروس پاپیلوما با تیپ های پرخطر آن (High Risk) باشد یا خیر حائز اهمیت است (۳۳).

¹ specificity

² conservative

³ screening

۱-۳-۹-۱ کاربرد های تست HPV DNA Typing

تست High risk HPV typing به هم‌منظور غربالگری سرطان دهانه رحم دارای دو مزیت عمده است: نخست آن که دفعات کم تر غربالگری را فراهم می سازد. در صورتیکه نتیجه هر دو تست پاپ اسمیر و این تست منفی باشند با اطمینان خاطر می توان گفت که نه تنها در حال حاضر سرطان دهانه رحم وجود ندارد بلکه احتمال بروز آن طی چند سال بعد غیر محتمل است. در واقع زمانی که هر دو تست منفی باشند احتمال وجود CIN ۲ و ۳ یک در ۱۰۰۰ است و احتمال اینکه طی در سه سال آینده CIN 2, 3 به وجود آید کمتر از یک در ۱۰۰۰ است. مزیت دوم تست غربالگری^۱ hrHPV مشخص ساختن زنانی است که نیازمند پایش به دفعات بیشتری هستند. در صورتیکه پاسخ تست hrHPV مثبت باشد اما پاپ اسمیر منفی باشد، احتمال منفی کاذب پاپ اسمیر زیاد است. به عبارت دیگر خطر پیشرفت این بیمار به سمت CIN 2,3 و سرطان زیاد است لذا زنانی که این نتایج را دارند باید به دفعات بیشتری پیگیری شوند و از بین این دسته از زنان آنهایی که انواع ۱۶ و ۱۸ برایشان مثبت است در معرض بیشترین خطر سرطان دهانه رحم قرار داشته و باید فوراً به کولپوسکوپی ارجاع داده شوند (۳۰).

بیانیه^۲ (SGO) راجع به نقش انجام تست HPV در پیشگیری و تعیین سرطان دهانه رحم اشاره می کند که نزدیک به ۵۰٪ ضایعات توسط یکبار تست پاپ اسمیر تشخیص داده نمی شوند که می توان آنها را با افزودن تست HR HPV مشخص کرد. تست hr HPV در ایالات متحده به طور شایع در تریاژ (بررسی) تست پاپ اسمیر حد واسطه^۳ برای مشخص کردن زنانی که باید به کولپوسکوپی ارجاع شوند استفاده می شود. این تست

¹ HIGH RISK HPV

² Society of Gynecologic Oncologists

³ equivocal

همچنین به عنوان تست همزمان^۱ به طور گسترده برای انجام غربالگری اولیه در کنار پاپ اسمیر در زنان ۳۰ سال و بالاتر پذیرفته شده است، زیرا زنانی که تست HR-HPV آنها منفی باشد احتمال پیشرفتشان به سمت سرطان بالینی دهانه رحم طی سال های آینده بسیار اندک است (۲۶).

۱-۹-۳-۲ نحوه تفسیر نتایج تست HPV DNA Typing:

انجام تست hrHPV به منظور تست غربالگری باید در زنان ۳۰ سال و بالاتر انجام شود و نه زیر ۳۰ سال و باید در کنار تست پاپ اسمیر باشد، نه به تنهایی. اگر نتیجه هر دو تست منفی، باشد و بیمار نقص سیستم ایمنی نداشته باشد (مثل HIV+ پیوند عضو، مصرف مزمن کورتون) می توان فواصل انجام تست را به سه سال افزایش داد. اما در صورتیکه پاپ اسمیر منفی باشد ولی تست hrHPV مثبت باشد به خصوص با ژنوتایپ های ۱۶ و ۱۸ بیمار به کولپوسکپی ارجاع داده می شود. در صورتیکه نتیجه کولپوسکپی منفی باشد یکسال بعد هر دو تست تکرار میشوند و اگر منفی باشند میتوان سه سال بعد غربالگری را انجام داد. اگر سیتولوژی غیرطبیعی باشد بدون توجه به نتیجه تست hrHPV بیمار طبق گایدلاین بررسی میشود. انجام تست hrHPV به تنهایی و بدون انجام سیتولوژی به منظور غربالگری مورد تأیید^۲ FDA قرار نگرفته است اما در کشور هلند از این الگوریتم استفاده می شود (۲۰، ۳۰).

¹ co-test

² سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا

۱-۹-۴ استفاده از بیومارکرها در تشخیص سرطان دهانه رحم:

واژه بیومارکر نخستین بار در سال ۱۹۸۰ توسط موسسه ملی بهداشت آمریکا (NIH) مورد استفاده قرار گرفت و عبارت است از یک شاخص قابل سنجش از برخی حالت‌ها و شرایط بیولوژیک یا زیستی. در پزشکی وجود یک بیومارکر در بدن یا قسمت خاصی از آن ممکن است نشان‌دهنده یک بیماری خاص و یا حالت‌های مختلف یک بیماری باشد. در ۲۰ سال گذشته تلاش‌های بسیاری برای شناسایی و معرفی بیومارکرها به عنوان روشی جدید برای غربالگری و تشخیص سرطان دهانه رحم آغاز شده است. با توجه به نقش اصلی و مهم آلودگی با ویروس HPV در ایجاد و پیشرفت سرطان دهانه رحم بیشتر تلاش‌ها بر روی بیومارکرهای اختصاصی مرتبط با این ویروس و یا تغییرات در پروتئین‌های چرخه سلولی میزبان که به طور اختصاصی در سرطان دهانه رحم تحت تاثیر قرار می‌گیرند متمرکز شده است. دو دسته اصلی بیومارکرهای تشخیصی سرطان دهانه رحم شامل: بیومارکرهای ویروسی (HPV) و بیومارکرهای سلولی میزبانی (۳۴).

۱-۹-۴-۱ بیومارکرهای ویروسی و تست HPV mRNA Detection:

همانطور که پیش‌تر اشاره شد علت اصلی تغییر و ترانسفرم شدن سلول‌های ناحیه ی سرویکس به سمت سلول‌های بدخیم و سرطانی بیان ژنهای E6 و E7 ویروس HPV در این سلول‌ها می‌باشد که ابتدا از لایه بازال آغاز شده و سپس به اپیتلیوم می‌رسد، پس با توجه به این نکته که باید ارتباط معناداری بین آغاز بیان و میزان بیان این ژنها و شدت و سیر بدخیمی‌ها به سمت سرطان دهانه رحم وجود داشته باشد تئوری‌های اولیه برای شناسایی mRNA این پروتئین‌ها در سرویکس به عنوان یکی از تست‌های تشخیصی و غربالگری مورد بحث در سال

های اخیر تبدیل شده است. متدهای خانگی^۱ مختلفی در سال های اخیر برای شناسایی این رونوشت ها^۲ به کار برده شده است که اصلی ترین آن Real time PCR بوده است. بعد از استفاده از متدهای دستی تست های تجاری با اساس های گوناگون نیز برای شناسایی این رونوشت ها ابداع شد هرچند که هنوز به جز یکی از آنها (Aptima Gene probe) مابقی توسط FDA تایید نشده اند. هر چند این تست ها هنوز در مرحله بررسی کلینیکی می باشند اما مطالعات مختلف به نقش آنها در کمک به تریاژ بیماران با پاپ اسمیر های غیر طبیعی اشاره داشته است (۲۶, ۳۵).

۱-۹-۴-۲ بیومارکر های سلولی میزبان در تشخیص سرطان دهانه رحم:

با توجه به پیش رفت شگرف علم پزشکی مولکولی در سال های اخیر، نسل بعدی بیومارکری که می توانند به غربالگری تشخیص و یا تایید سرطان ها از جمله سرطان دهانه رحم کمک کنند یا در مشخص کردن سیر آنها اطلاعاتی را در اختیار متخصصان قرار دهند احتمالا بیومارکرهای سلولی میزبان خواهند بود. پژوهشگران زیادی در سالهای اخیر تلاش خود را بر روی شناسایی این بیومارکرها و بررسی آنها در مراحل مختلف بدخیمی سرطان دهانه رحم متمرکز کرده اند (۳۱).

از آنجا که سیکل ویروس HPV و نقش پروتیین های آن در سالهای اخیر به روشنی شناسایی شده است و اطلاعات خوبی نیز در مورد مسیرهای سلولی و تاثیر ژنهای HPV بر روی پروتیین های سلولی به خصوص پروتیین های سرکوب کننده تومور در دسترس است، امکان استفاده از تغییرات این پروتیین ها به عنوان بیومارکر

¹ In house

² transcripts

های تشخیصی فراهم آمده است. از جمله این پروتئین ها می توان به MCM2 و TOP2A ، KI-67 ، P14ARF و P16INK4a اشاره کرد (۳۵، ۲۶).

۱-۹-۴-۲-۱ بیومارکر P16INK4a :

لوکوس INK4A/ARF که همچنین به نام CDKN2A نیز شناخته می شود دارای دو پروتئین به نام های P14ARF و P16INK4a می باشد. این لوکوس بر روی کروموزوم ۹ قرار دارد (۳۶). P16INK4a یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی است که از ۱۵۶ اسید آمینه تشکیل شده و یک مهار کننده چرخه سلولی می باشد. در سلول های طبیعی در مرحله انتقال فاز سلولی G1 به S یک مرحله کنترلی^۱ وجود دارد که توسط سه ژن P53، Rb و CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) کنترل می شود. P53 یک فاکتور رونویسی است که بیان ژن های دخیل در توقف چرخه سلولی و آپوپتوز مثل cyclin dependent kinase inhibitor p21 را تحریک می کند. در نتیجه تخریب این پروتئین سبب عدم تنظیم رشد سلولی می شود. همچنین E6 باعث افزایش تنظیم کمپلکس تلومرازی می شود که در نهایت باعث حفظ DNA تلومریک شده و ساعت مولکولی سلول را از تنظیم خارج می کند (۳۵).

PRb (Retinoblastoma protein) یک مولکول مهارکننده تومور است که در حالت غیر فسفریله به فاکتور رونویسی E2F متصل می شود و از عملکرد آن جلوگیری می کند. در حالیکه فسفریله شدن Rb سبب آزاد شدن E2F و بیان آنزیم های همانندسازی می شود که به موجب آن سلول از فاز G1 به S منتقل می شود. فسفریلاسیون

¹ checkpoint

این پروتئین توسط آنزیم‌های کینازی صورت می‌گیرد که به پروتئین دیگری به نام cyclin وابسته هستند از این رو به این آنزیم‌ها Cyclin-dependent kinase (CDK) گفته می‌شود که ۱۱ نوع از آن‌ها در سلول‌ها وجود دارد. اتصال دو مولکول CDK4/6 به cyclin D سبب تشکیل کمپلکس پروتئینی شده که پروتئین Rb را فسفریله می‌کند. همانطور که اشاره شد، محصول ژن مهار کننده کیناز وابسته به سایکلین 2A (CDKN2A) دو پروتئین P16INK4a و P14ARF می‌باشد. P16INK4a یک پروتئین مهارکننده تومور است که سبب مهار تشکیل کمپلکس پروتئینی فسفریله کننده Rb می‌شود که در نتیجه آن Rb به E2F متصل مانده و سلول در فاز G1 نگه داشته می‌شود (۱).

زمانی که سلول با ویروس HPV آلوده شده و ویروس وارد فاز لیزوژنی می‌گردد، پروتئین‌های ویروسی E6 و E7 نقش اساسی در ایجاد بدخیمی دارند چراکه پروتئین E5 از خاصیت ترانسفرم کنندگی ضعیفی برخوردار می‌باشد و همچنین هنگام ادغام DNA ویروس با سلول میزبان حذف می‌شود بنابراین نمی‌توان نقشی برای آن در وقایع تاخیری کارسینوژنز HPV در نظر گرفت (۱۲).

پروتئین E6 که در هنگام لیزوژنی و اتصال ژنوم ویروسی به ژنوم سلول میزبان بیان می‌شود، سبب تحریک تخریب پروتئین P53 از طریق ubiquitization می‌شود که طی آن پروتئین E6 به ubiquitin-protein ligase (E6AP) متصل می‌شود و کمپلکس تشکیل شده قادر به اتصال و ubiquitylate کردن P53 می‌باشد پروتئین E7 که توسط HR-HPV^۱ تولید می‌شود به ناحیه‌ای از پروتئین Rb به نام pocket domain متصل می‌شود. این ناحیه برای انجام فعالیت مهار Rb ضروری می‌باشد و بسیاری از موتاسیون‌ها در آن اتفاق می‌افتد. E7 اتصال Rb و E2F را مختل می‌کند که در نتیجه آن E2F در فرم فعال آزاد شده و سبب همانندسازی و

¹ High risk HPV

تقسیم سلولی می‌شود. بنابراین تشکیل کمپلکس میان پروتئین‌های انکوژن و پروتئین‌های مهارکننده تومور نقش اساسی در transformation سلول ایفا می‌کند و منجر به اختلال در عملکرد فیزیولوژیکی محصولات ژن‌های مهار کننده تومور از جمله P16INK4a می‌شود. در سلول‌های نرمال رونویسی P16INK4a توسط مکانیسم مهار polycomb که از طریق متیلاسیون histone H3 trimethylation of lysine 27 (H3K27) عمل می‌کند، مهار می‌شود. Oncogene-induced senescence (OIS) یکی از پاسخ‌های درونی سلول برای مهار تومور می‌باشد که در نتیجه آن دمتیلاسیون histone H3 trimethylation of lysine 27 (H3K27) توسط KDM6B histone lysine demethylase 6B، سبب القای بیان P16INK4a می‌شود. در بسیاری از سلول‌ها سرطانی در جهت غیر فعال کردن OIS، ژن P16INK4a به میزان زیادی موتاسیون پیدا می‌کند یا از طریق متیلاسیون خاموش می‌شود. اما در بعضی سرطان‌های انسانی از جمله سرطان‌هایی که به وسیله عفونت با HR-HPV ایجاد می‌شود، بیان پروتئین E7 سبب افزایش بیان KDM6B و ایجاد OIS شده که در نتیجه آن بیان بیش از حد P16INK4a دیده می‌شود (۳۶-۳۸).

بیان بیش از حد P16INK4a به وسیله این مکانیسم در بسیاری از سلول‌های پیش سرطانی و سرطانی نشان داده شده است در حالی که بیان این مولکول در بافت رحم نرمال صفر و یا کم می‌باشد. در نتیجه این مولکول یک بیومارکر مناسب و در دسترس برای شناسایی سیر نامنظم و تغییرات چرخه سلولی برای آغاز بدخیمی می‌باشد که می‌توان با روش‌های ایمونوهیستوشیمی، micro array و Real-Time PCR آن را شناسایی کرد (۳۵). در سال‌های اخیر از این پروتئین برای اهداف تشخیصی در نمونه‌های مربوط به سرطان دهانه رحم در زنان استفاده شده است و توانسته است تکرار پذیری جوابها را افزایش دهد و بنظر می‌رسد بتواند در تشخیص ضایعات پیش سرطانی و همچنین پیش بینی سیر آنها کمک کننده باشد (۳۹، ۴۰).

با توجه به اهمیت موضوع سرطان دهانه رحم و امکان درگیری احتمالی نیمی از افراد جامعه با آن و همچنین اهمیت تشخیص و پیگیری دقیق و زود هنگام بیماران و با توجه به هزینه های کلان اقتصادی و اجتماعی که در صورت کم کاری در این حوزه می تواند واقع شود، همچنین با توجه به کیفی و نیمه کمی بودن نتایج گذشته و میزان بسیار اندک مطالعات در این زمینه در ایران سبب شد تا در این مطالعه بررسی بیان ژن P16INK4a به عنوان بیومارکر ملکولی در تشخیص سرطان دهانه رحم یا مراحل بدخیمی های قبل از آن در نمونه های بیوپسی پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم به روش کمی و مقایسه نتایج آن با نتایج حاصل از پاتولوژی مورد هدف قرار داده شده است، علاوه بر آن نتایج به دست آمده از این طرح می تواند امکان مقایسه نتایج به دست آمده از این بیومارکر با سایر بیومارکرهای مولکولی تشخیصی در سرطان دهانه رحم را فراهم آورد.

فصل دوم

مروری بر مطالعات

(انجام شده)

۱. در سال ۱۳۸۸ در بابل - ایران ، شریتراران و همکاران با کار بر روی ۹۶ نمونه بافتی دهانه رحم شامل ۳۰ نمونه سالم، ۳۰ نمونه متاپلازی نارس، ۳۰ نمونه دیسپلازی و ۶ نمونه سرطان دهانه رحم با روش ایمونو هیستوشیمی بیان این ژن را در ۱۰ درصد نمونه های نرمال، ۳۰ درصد نمونه های متاپلازی، ۶۳/۳ درصد نمونه های دیسپلازی و ۸۳/۳ نمونه های سرطانی گزارش کرد. گزارش شد بین وضعیت پاتولوژی و حضور این بیومارکر ارتباط معناداری وجود دارد. همچنین برای این بیومارکر با روش ایمونو هیستوشیمی ویژگی ۸۰ درصدی گزارش کردند اما در وضعیت دیسپلازی حساسیت ۶۳/۳ درصدی گزارش شد (۴۰).

۲. در سال ۲۰۰۴ در روسیه Volgareva و همکاران به بررسی حضور پروتیین P16INK4a در نمونه های نرمال و سرطانی دهانه رحم با استفاده از آنتی بادی اختصاصی پرداختند. آنها اینطور نتیجه گرفتند که با وجود آنکه در سیر پیش رفت به سمت سرطان دهانه رحم نمونه های با پروتیین P16INK4a نیز افزایش پیدا میکنند اما موارد سرطان دهانه رحم و موارد پیش سرطانی بدون بیان P16INK4a نیز موجود هستند. بنابراین منفی بودن حضور پروتیین P16INK4a نمیتواند الزاما نشانه عدم حضور هیچ گونه بدخیمی در دهانه رحم باشد (۳۶).

۳. در سال ۲۰۰۵ در برزیل Lambert و همکاران با کار بر روی ۴۸ نمونه دچار مراحل پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم به این نتیجه رسیدند که بیان ژن P16INK4a در تمام نمونه های سرطانی صورت گرفته است. همچنین در یکی از ۳ نمونه LSIL و ۱۸ عدد از ۱۹ نمونه HSIL بیان P16INK4a صورت گرفته بوده است، آنها در بررسی خود از روش ایمونو هیستوشیمی استفاده کردند (۳۷).

۴. در سال ۲۰۰۶ در برزیل Queiroz و همکاران با بررسی ۶۰ نمونه پارافینه با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال علیه P16INK4a به بررسی حضور این پروتیین در نمونه های نرمال، پیش سرطانی و سرطانی پرداختند. آنها دریافتند ۱۰٪ از نمونه های نرمال و تمام نمونه های سرطانی از نظر بیان این ژن (با درجات مختلف بیان) مثبت هستند. آنها نیز ارتباط معنا داری بین حضور پروتیین P16INK4a و افزایش مراحل بدخیمی به سمت سرطان پیدا کردند (۴۱).

۵. در سال ۲۰۱۰ در رومانی SIMIONESCU و همکارانش با بررسی ۲۶ مورد از بافت های پارافینه intraepithelial lesions از لحاظ حضور و میزان چند پروتیین که یکی از آنها نیز P16INK4a بوده است با روش ایمونوهیستولوژی نتایج زیر را اعلام کرده اند. ۴۲ درصد از نمونه های LSIL و ۱۰۰ درصد از نمونه های HSIL از نظر بیان این پروتیین مثبت در نظر گرفته شدند. همچنین با افزایش از LSIL به HSIL میزان حضور پروتیین در بافت نیز افزایش نشان داده است (۴۲).

۶. در سال ۲۰۱۰ در مالزی Geok Chin Tan و همکاران در مطالعه مشابهی ۱۲۹ نمونه CIN و ۷۹ نمونه SCC را که به صورت بافت پارافینه بودند با روش آنتی بادی مونو کلونال از لحاظ حضور پروتیین P16INK4a مورد بررسی قرار دادند. ۲۵/۴ درصد نمونه های CIN1، ۴۲/۹ درصد نمونه های CIN2 و ۹۵/۹ درصد نمونه های CIN3 و همچنین ۹۸/۶ درصد مونه های SCC از نظر بیان این پروتیین

مثبت گزارش شدند. یک ارتباط معنی دار خطی بین افزایش درجه بدخیمی به سمت سرطان دهانه رحم و افزایش میزان بیان این پروتیین گزارش شد (۴۳).

۷. در سال ۲۰۱۰ در هند Ruchi Gupta و همکاران به بررسی ۱۰۰ بافت پارافینه شامل ۲۰ کیس از هرکدام از مراحل Normal, CIN 1 2 3 , SCC از منظر بیان پروتیین P16INK4a با روش آنتی بادی مونوکلونال موشی پرداختند. ۱۸ مورد از ۲۰ مورد بافت نرمال منفی گزارش شد. ۲۰ درصد از موارد CIN1 و ۴۵ و ۵۵ درصد از موارد CIN 2 و CIN 3 بیان نشان دادند، همچنین تمام کیس های سرطانی بیان پروتیین P16INK4a را نشان دادند. در این مطالعه نیز همچنان نتیجه گیری شد با حرکت از نرمال به سمت سرطان دهانه رحم بیان پروتیین P16INK4a افزایش نشان می دهد (۴۴).

۸. در سال ۲۰۱۱ در کشور آلمان Keyserling و همکارانش در قسمتی از مطالعه خود بر روی نمونه های نرمال و HSIL که از نظر میزان بیان ژن P16INK4a با روش Real Time PCR انجام می شد با بررسی ۴۵ نمونه ی HSIL در مقابل ۴۸ نمونه ی نرمال و با استفاده از ژن ACTB به عنوان ژن رفرانس و Internal Control افزایش بیان ۶/۲۷ برابری را در بیان P16INK4a در نمونه های HSIL نسبت به نمونه های نرمال گزارش کردند (۴۵).

۹. در سال ۲۰۱۱ در لیتوانی Simanaviciene و همکاران به بررسی حضور P16INK4a mRNA در نمونه های دچار بدخیمی سرطان دهانه رحم برای برقراری رابطه ای بین بیان این ژن و شدت و

میزان بدخیمی با روش Real Time PCR پرداختند. آنها از ژن Integrin به عنوان کنترل داخلی (internal Control) استفاده کردند که در نهایت بالاترین میزان بیان در نمونه های HSIL مشاهده شد و افزایش بیان با افزایش درجه دیپلازی ارتباط معنا داری داشت. جالب آنکه در این مطالعه میزان بیان ژن P16INK4a در نمونه های سرطان سرویکس به نسبت نمونه های با درجات بالای نئوپلازی کاهش قاب توجهی را نشان میداد. پایین ترین میزان بیان نیز مربوط به نمونه های نرمال گذارش شد (۴۶).

۱۰. در سال ۲۰۱۵ در بوسنی Gajanin و همکاران با بررسی ۷۳ نمونه بافت پارافینه شامل ۳۴ نمونه دیسپلازی و ۳۹ نمونه بافت التهابی به روش ایمونوهیستوشیمی از لحاظ بیان پروتیین P16INK4a اعلام کردند که ۶۷/۶۵ درصد از نمونه های دیسپلازی و ۳۸/۵ درصد از نمونه های التهابی از نظر بیان این پروتیین مثبت بوده اند. در نهایت اینطور نتیجه گیری شد که حضور و میزان بیان بیان این پروتیین با میزان بدخیمی در دهانه رحم ارتباط مستقیم دارد (۴۷).

فصل سوم

مولود و روشی ها

۳-۱ اهداف و فرضیات:

۳-۱-۱ هدف اصلی طرح:

تعیین میزان بیان ژن P16INK4a به عنوان بیومارکر مولکولی در تشخیص پیش سرطان و سرطان دهانه رحم در

نمونه‌های بیوپسی دهانه رحم استان قزوین با روش Real-Time PCR

۳-۱-۲ اهداف فرعی:

-تعیین میزان اختلاف میان بیان P16INK4a در بدخیمی‌های دهانه رحم و گروه کنترل.

-تعیین میزان اختلاف میان نتایج بدست آمده از P16INK4a mRNA Detection به عنوان یک بیومارکر

برای غربالگری بدخیمی بانتهای حاصل از هیستولوژی در صورت امکان.

۳-۱-۳ اهداف کاربردی:

-روش مولکولی مورد استفاده در این مطالعه به عنوان بیومارکر تشخیصی مکمل میتواند در غربالگری و یا

تشخیص سرطان دهانه رحم مورد استفاده قرار گیرد.

-نتایج حاصل از این مطالعه می تواند در فراهم آوردن اطلاعات زمینه ای و تکنیکی برای ساخت کیت های

تشخیصی با استفاده از بیومارکر P16INK4a در تشخیص بدخیمی های دهانه رحم موثر باشد.

۳-۱-۴ فرضیه ها:

میزان بیان P16INK4a در نمونه های پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم نسبت به گروه کنترل بیشتر است.

۳-۲ مواد و روش ها :

۳-۲-۱ جدول متغیرها

جدول ۳-۱ جدول متغیرهای مطالعه

مقیاس	تعریف علمی	کیفی		کمی		وابسته	مستقل	عنوان متغیر
		رتبه ای	اسمی	گسسته	پیوسته			
طبقه بندی Bethesda	تغییرات سلولی پیشرونده بر اساس آزمایشات سیتولوژی		✓				✓	شدت ضایعات
مقدار کیفی و کمی بیان بر اساس نتایج Real Time PCR	تعیین مقدار بیان ژن (P16INK4a) با استفاده از روش Real time PCR				✓	✓		بیان ژن P16INK4a
مقدار کیفی و کمی بیان بر اساس نتایج Real Time PCR	تعیین مقدار بیان ژن House keeping ACTB با استفاده از روش Real time PCR				✓		✓	بیان ژن ACTB
سال	تعداد سال ها که از عمر (روز تولد) یک فرد می گذرد				✓		✓	سن

۳-۲-۲ روش انجام پژوهش و نمونه گیری:

۳-۲-۲-۱ نوع مطالعه :

اپیدمیولوژی - مولکولی توصیفی

۳-۲-۲-۲ جامعه‌ی مورد مطالعه و حجم نمونه:

بلوک‌های پاتولوژی غیرتکراری فیکس شده با فرمالین و محصور در پارافین^۱ نمونه‌های بیوپسی دهانه رحم پیش سرطانی و سرطانی استان قزوین مربوط به بیمارانی که طی سال‌های ۹۴-۱۳۷۸ به بیمارستان‌های قزوین مراجعه کرده و اطلاعات پرونده‌ای آنان نیز موجود می‌باشد .

بر اساس پارامترهای آماری مطالعه تعیین حجم نمونه تعداد نمونه‌ها ۱۴۴ نمونه می‌باشد که به صورت بافت پارافینه پاتولوژی از کلکسیون‌های جمع‌آوری شده در بیمارستان‌های استان به صورت تصادفی انتخاب می‌شود. این عدد با توجه به در نظر گرفتن ۹۰٪ درصد برای P و ضریب اطمینان ۹۵ درصد و با دقت ۰/۰۷ حجم نمونه بر اساس فرمول ۱۴۴ به دست می‌آید.

با توجه به محدودیت‌های مالی برای انجام این پروژه تعداد نمونه‌ها در مطالعه حاضر ۱۱۱ در نظر گرفته شد .
(d: ۰/۰۸). همچنین تعداد ۳۰ نمونه از بافت دهانه رحم نرمال به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

$$\frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 111$$

^۱ FFPE

۳-۲-۲-۳ معیارهای ورود به مطالعه برای بیماران:

بلوک‌های پاتولوژی پارافینه غیرتکراری که اطلاعات پرونده‌ای آنان نیز موجود می‌باشد و به‌عنوان نمونه‌های نرمال ، پیش سرطانی و سرطانی تشخیص داده شده‌اند.

۳-۲-۲-۴ معیارهای خروج از مطالعه برای بیماران:

نمونه‌های تکراری

بلوک‌های پاتولوژی پارافینه که اطلاعات پرونده‌ای آنان موجود نمی‌باشد .

نمونه‌هایی که از نظر کیفیت استخراج RNA قابل بررسی و مطالعه نباشند

۳-۲-۲-۵ ملاحظات اخلاقی:

محرمانه نگه‌داشتن داده‌های شخصی

عدم سوءاستفاده از اطلاعات شخصی

۳-۲-۳ روش انجام کار:

۳-۲-۳-۱ مرحله برش بافت ها:

ابزار و مواد مورد استفاده:

۱- دستگاه میکروتوم

۲- گلو تار آلد هید ۲ درصد

۳- میکروتیوب استریل عاری از نوکلئاز

۴- پنس و اسکالپل استریل

*زمان تخمینی برای هر بلوک: ۵ دقیقه

بلوک های فیکس شده با فرمالین و محصور در پارافین مربوط به دهانه رحم افراد سالم و بیماران دریافتی از آرشیو پاتولوژی بیمارستان کوثر که وجود بدخیمی و محل آن به تشخیص و تایید پزشک متخصص پاتولوژی رسیده بود بعد از طبقه بندی و شماره گذاری و حذف نمونه های تکراری به وسیله دستگاه میکروتوم (Hacker instrument- USA) برش خوردند (۲ تا ۴ برش ۵ میکرومتری)

قبل از انجام برش های اصلی یک برش ۱۰ میکرومتری از روی هر بلوک به منظور حذف آلودگی برداشته شد (Trimming). برای جلوگیری از انتقال آلودگی در بین هر برش بعد از پاکسازی های ماکروسکوپی از گلو تار آلد هید ۲ درصد برای پاکسازی تیغه دستگاه و ابزار استفاده شد تا هرگونه اسید نوکلئیک دچار فروپاشی

ساختاری گردد برش ها در میکروتیوب های استریل عاری از DNase, RNase که از قبل آماده شده بود جمع آوری و شماره گذاری شدند.



تصویر ۱-۳ دستگاه میکروتوم مورد استفاده در این مطالعه (Hacker instrument – USA)

۲-۳-۲-۳ مرحله ی استخراج RNA:

ابزار و مواد مورد نیاز:

۱. اتانول مطلق
۲. اتانول ۷۰ درصد
۳. زایلن
۴. SDS 10%

۵. تیوب استریل ۱/۵

۶. سمپلر و سر سمپلر در تمام اندازه ها

۷. کیت استخراج

۸. هود میکروبیولوژی کلاس ۲

۹. سانتریفوژ

۱۰. ورتکس و اسپین

۱۱. انکوباتور ۵۵ درجه

۱۲. Heat Block

*زمان تخمینی : هر ران ۱۲ تایی استخراج ۸ ساعت

استخراج RNA از بافت فیکس شده با استفاده از کیت Roche High Pure FFPE Micro kit (Roche

diagnostics, Indianapolis, IN, USA) انجام شد. تمام مراحل در زیر هود کلاس ۲ میکروبیولوژی انجام

گرفت. قبل از شروع استخراج RNA ، مرحله پارافین زدایی بافت ها مطابق دستورالعمل زیر انجام شد:

برای هر بافت با برش هایی با ضخامت کمتر از ۱۰ میکرومتر در تیوب ۱/۵ میلی لیتری:

۱. اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر زایلن

۲. سه بار ورتکس برای ۴ ثانیه

۳. انکوباسیون برای ۲ دقیقه در دمای اتاق

۴. سه بار ورتکس برای ۴ ثانیه

۵. انکوباسیون برای ۵ دقیقه در دمای اتاق
۶. سانتریفوژ برای ۲ دقیقه در ۱۶۰۰۰g
۷. بیرون ریختن مایع رویی بدون حذف بافت موجود در کف پلیت
۸. تکرار مراحل ۱ تا ۷
۹. اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق
۱۰. سه بار ورتکس برای ۴ ثانیه برای کنده شدن بافت از کف
۱۱. سانتریفوژ برای ۲ دقیقه در ۱۶۰۰۰g
۱۲. بیرون ریختن مایع رویی بدون حذف بافت موجود در کف پلیت
۱۳. اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق
۱۴. سه بار ورتکس برای ۴ ثانیه برای کنده شدن بافت از کف
۱۵. سانتریفوژ برای ۲ دقیقه در ۱۶۰۰۰g
۱۶. بیرون ریختن مایع رویی بدون حذف بافت موجود در کف پلیت
۱۷. قرار دادن تیوب حاوی بافت با در باز در انکوباتور ۵۵ درجه برای مدت ۱۵ دقیقه برای تبخیر الکل

اضافی

بعد از خشک کردن برش ها و از بین رفتن الکل حاصل از شست و شو مراحل استخراج RNA انجام شد ،
مراحل شامل:

۱. اضافه کردن ۶۰ میکرولیتر بافر لیز کننده بافت و ۱۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات و ۳۰ میکرولیتر

Proteinase K

۲. سه بار ورتکس برای ۴ ثانیه

۳. انکوباسیون برای مدت ۳ ساعت در ۵۵ درجه

۴. اضافه کردن ۲۰۰ میکرو لیتر Binding buffer و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق

۵. سه بار ورتکس برای ۴ ثانیه

۶. عبور محلول به دست آمده از فیلتر مخصوص و اتصال اسید های نوکلئیک به فیلتر

۷. ۲ مرحله سانتریفیوژ در ۸۰۰۰g و ۱۶۰۰۰g برای خروج سایر مواد محلول و دورریز آنها

۸. اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر محلول DNase برای از بین بردن DNA موجود در بافت

۹. انکوباسیون برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق

۱۰. اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر Wash buffer 1

۱۱. سانتریفیوژ ۱۵ ثانیه در ۸۰۰۰g و دور ریختن مایع خارج شده از فیلتر

۱۲. اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر Wash buffer 2

۱۳. سانتریفیوژ ۱۵ ثانیه در ۸۰۰۰g و دور ریختن مایع خارج شده از فیلتر

۱۴. اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر Wash buffer 2

۱۵. سانتریفیوژ ۱۵ ثانیه در ۸۰۰۰g و دور ریختن مایع خارج شده از فیلتر

۱۶. ۲ دقیقه سانتریفیوژ در حداکثر دور (۱۶۰۰۰g) برای خروج تمام بافرهای شست و شو

۱۷. اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر بافر شست و شوی RNA و انکوباسیون برای مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق،

سپس سانتریفیوژ در ۸۰۰۰g برای جمع آوری RNA حاصل در میکروتیوب استریل عاری از نوکلئاز.

بعد از استخراج، کیفیت نمونه های RNA استخراجی با نانو دراپ (Nanodrop spectrophotometer- USA) بررسی شد، طول موج های ۲۸۰، ۲۶۰، ۲۳۰ نانومتر و نسبت ۲۸۰/۲۶۰ برای بررسی خلوص RNA در مقابل پروتیین (ایده آل: بین ۱/۸ تا ۲) و نسب ۲۳۰/۲۶۰ برای بررسی میزان عوامل مداخله کننده دیگر در واکنش PCR. (ایده آل : بین ۲ تا ۲/۲)

مواردی که در آزمون نانودراپ مردود شدند در صورت امکان استخراج مجدد انجام شده و در صورت عدم وجود بافت برای استخراج مجدد از مطالعه حذف شدند. سپس بلافاصله cDNA از RNA ساخته شد و مابقی RNA جهت حفظ به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

۳-۳-۲-۳ ساخت cDNA و واکنش reverse transcriptase PCR:

ابزار و مواد مورد نیاز:

۱- کیت ساخت cDNA

۲- سمپلر و سرسمپلراستریل و عاری از نوکلئاز

۳- آب مقطر DEPC Treated

۴- ترموسایکلر

۵- ورتکس و Spin

*زمان تخمینی : هر ران ۱۲ تا ۲ ساعت

برای تبدیل RNA استخراج شده از بافت پاراتینه به cDNA جهت انجام واکنش PCR از کیت Bioneer (Bioneer, Korea) AccuPower CycleScript RT PreMix (dN6) با پرایمرهای هگزامر تصادفی استفاده شد.

۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده به تیوب واکنش که به صورت آماده و لیوفیلیز بودند اضافه شد و با ۱۵ میکرولیتر آب مقطر DEPC Treated (شرکت سیناژن) به حجم ایده آل واکنش که ۲۰ میکرولیتر بود رسانده شد. بعد از ورتکس و Spin down برای انجام واکنش RT-PCR درون ترموسایکلر قرار داده شد. سیکل دمایی استفاده شده :

۴۵ درجه سانتی گراد برای ۶۰ دقیقه و سپس ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه.

بعد از پایان واکنش نمونه ها در منفی ۲۰ درجه سانتی گراد برای انجام واکنش PCR نگه داری شدند.

۳-۲-۳-۴ کنترل کیفیت استخراج:

با توجه به دشواری های استخراج RNA از بافت های فیکس شده و پاراتینه آرشیوی مربوط به سال های قبل و عدم اطلاع دقیق از شرایط فیکساسیون و نگه داری آنها، به مرحله کنترل کیفی استخراج مجدد علاوه بر نانودراپ برای اطمینان از حضور RNA و استخراج صحیح و عدم حضور مواد مداخله کننده در واکنش، PCR انجام گرفت.

با توجه به نوع بافت این مرحله ، شامل شناسای ژن Beta-Actin (ACTB) به عنوان به housekeeping Gene انسانی در تمام نمونه ها بود که با استفاده از پرایمر های ACTB ذکر شده در جدول پرایمر ها انجام شد.

متد مورد استفاده برای انجام واکنش SYBR GREEN بود و برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه (Applied Biosystems, CA, USA) Step One plus Real time system در آزمایشگاه رفرنس دانشگاه علوم پزشکی قزوین استفاده شد. همچنین مسترمیکس مورد استفاده برای TAKARA sybr Premix ExTaq II Sybr Green Master Mix (Japan) بود



تصویر ۲-۳ دستگاه ABI Step One plus Real time system مورد استفاده در این مطالعه

برای هر واکنش Real Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر:

۱- ۰/۷ میکرولیتر Primer mix

۲- ۲ میکرولیتر cDNA

۳- ۰/۴ میکرولیتر ROX Reference Dye

۴- ۱۰ میکرولیتر X master mix

۵- ۹/۶ میکرولیتر PCR grade Water

جدول ۲-۳ سیکل دمایی انجام واکنش Real Time PCR برای ژن ACTB

Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension
۲min \ ۹۵ C°	۳۰ sec, ۹۵ C°	۶۰ sec, ۶۰ C°	۶۰ sec, ۷۲ C°

نمونه هایی که از نظر ACTB Internal Control مثبت شدند برای بیان ژن انتخاب شدند.

۳-۲-۳ بررسی بیان ژن P16INK4a به روش Relative quantitative Real Time

PCR

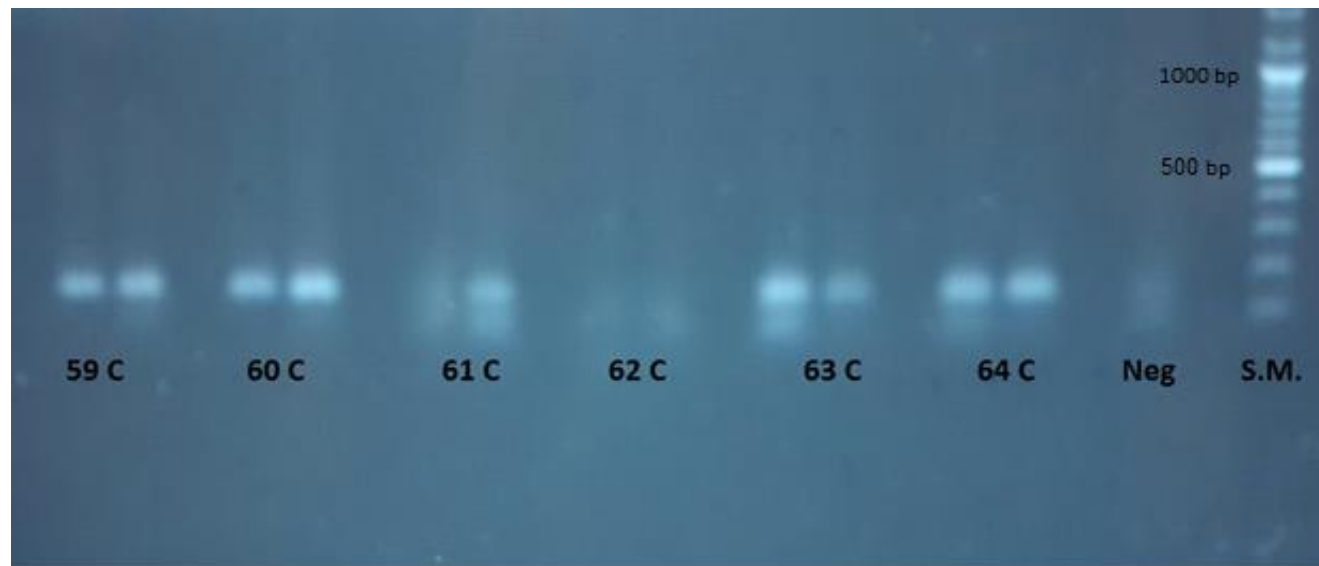
برای انجام این آزمایش نیاز به یک ژن house keeping با بیان ثابت به عنوان ژن رفرنس برای Normalize

کردن میزان بیان در گروه های مختلف بود که با توجه به مطالعات گوناگون در این مطالعه از ژن Actin Beta

ی انسانی به عنوان Reference Gene استفاده شد. بیان ژن های رفرنس (ACTB) و ژن هدف

(P16INK4a) به صورت همزمان در هر نمونه و در گروه های هدف و در گروه کنترل (Normal) در کنار هم اندازه گیری شد. متد مورد استفاده برای انجام واکنش SYBR GREEN بود و برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه (Applied Biosystems, CA, USA) Step One plus Real time system در آزمایشگاه رفرانس دانشگاه علوم پزشکی قزوین استفاده شد. همچنین مسترمیکس مورد استفاده TAKARA sybr Premix ExTaq II Sybr Green (TAKARA BIO INC Japan) بود

ابتدا برای پیدا کردن دمای مناسب گرادیانت از دماهای ۵۹ تا ۶۴ درجه سانتیگراد گذاشته شد. که تصویر آن در شکل ذیل نشان داده شده است. دمای ۶۰ درجه به عنوان دمای ایده آل انتخاب شد



تصویر ۳-۳ الکتروفورز گرادیانت دمایی (۵۹-۶۴ درجه) برای انتخاب دمای ایده آل انجام واکنش PCR

شرایط واکنش برای ژن ACTB در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر:

برای هر واکنش Real Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

۱- ۰/۷ میکرولیتر Primer mix

۲- ۲ میکرولیتر cDNA

۳- ۰/۴ میکرولیتر ROX Reference Dye

۴- ۱۰ میکرولیتر X master mix

۵- ۹/۶ میکرولیتر PCR grade Water

شرایط انجام واکنش برای ژن P16INK4a در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر:

برای هر واکنش Real Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

۱- ۰/۸ میکرولیتر forward primer

۲- ۰/۸ میکرولیتر Reverse Primer

۳- ۰/۴ میکرولیتر ROX Reference Dye

۴- ۲ میکرولیتر cDNA

۵- ۱۰ میکرولیتر X mastermix

۶- ۶ میکرولیتر PCR Grade water

جدول ۳-۳ سیکل دمایی انجام واکنش Real Time PCR برای ژن P16INK4a

Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Melt
۲min \ ۹۵ C°	۳۰ sec, ۹۵ C°	۶۰ sec, ۶۰ C°	۶۰ sec, ۷۲ C°	۵۰-۹۵ C 0.02 increase

جدول ۴-۳ پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه برای انجام واکنش Real Time PCR

پرایمر	سکانس پرایمر (۵-۳)	اندازه محصول
P16INK4a F	GGGGGCACCAGAGGCAGT	۱۵۹ bp
P16INK4a R	GGTTGTGGCGGGGGCAGTT	
ACTB F	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	۱۴۰ bp
ACTB R	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	

۳-۲-۳ روش ارزیابی و محاسبه میزان بیان ژن

تعیین کمیت Real Time به وسیله اندازه گیری تشعشع در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین به DNA دو رشته ای در انتهای هر چرخه تکثیر انجام گرفت. چرخه آستانه (CT) که در آن افزایش فلورسانس ثبت شده، در حد بالاتر از خط پایه برای اولین بار قابل تشخیص می گردد، برای هر یک از نمونه ها تعیین گردید. پس از اتمام واکنش PCR خط آستانه تعیین و داده های آمار توصیفی با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel انجام شد. پس از پایان آزمایش C_t نمونه ها برای محاسبه میزان افزایش یا کاهش بیان ژن با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ و با استفاده از داده های آمار توصیفی مورد استفاده قرار گرفت.

روش $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta Ct (\text{treated}) = Ct (\text{Target A -treated}) - Ct (\text{Ref B-treated})$$

$$\Delta Ct (\text{control}) = Ct (\text{Target A-control}) - Ct (\text{Ref B-control})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated}) - \Delta Ct (\text{control})$$

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} = \text{میزان بیان استاندارد شده ژن هدف}$$

در مورد مطالعه ما این فرمول به صورت زیر می باشد:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{P16INK4a treat} - \text{ACTB treat}) - \Delta Ct (\text{P16INK4a control} - \text{ACTB ontrol})$$

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} = \text{تغییرات میزان بیان}$$

۷-۳-۲-۳ الکتروفورز محصولات PCR:

برای تایید محصولات از نظر طول قطعه، به صورت تصادفی بر روی آگاروز ۲ درصد الکتروفورز انجام شد تا از نظر طول قطعه تایید و با هم مقایسه شوند.

مواد و وسائل مورد نیاز

- پودر آگارز (Agarose)
- بافر TBE 1X (Tris-HCl Boric Acid EDTA)
- Loading Buffer (Fermentase)
- Marker (Ladder) (Fermentase)
- تانک الکتروفورز (Electrophoresis Tank)
- منبع تغذیه الکتریکی (Power supply)
- سمپلر و سرسمپلر (Tip)
- سینی ژل (Gel Tray)
- شانه ژل (Gel Comb)
- Gel Red 1X

برای انجام الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. میزان ۲ گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE 1X حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن و بسته شدن ژل، آن را از قالب خارج کرده و به داخل تانک الکتروفورز انتقال دادیم. برای هر ۶ میکرولیتر نمونه ۱ میکرولیتر از Loading DYE و ۱

میکرولیتر Gel Red 1X مخلوط و همراه نمونه در چاهک نمونه گذاری میکنیم، سپس بعد از انجام الکتروفورز برای تایید حضور باند های مورد نظر ژل را در دستگاه Gel Doc گذاشته و حضور باند ها را در مقایسه با لدر استاندارد تایید شد.



تصویر ۳-۴ تانک الکتروفورز، منبع تغذیه مورد استفاده در مطالعه حاضر



تصویر ۳-۵ دستگاه آشکار ساز مورد استفاده در مطالعه حاضر

۳-۲-۸ تعیین توالی محصولات PCR (Sequencing)

محصولات PCR برای ژن P16INK4a برای اطمینان از حضور این ژن و اختصاصیت واکنش انجام شده توسط دستگاه Applied Biosystems 31300 Genetic Analyzer (USA) توالی یابی شدند که نتایج با نرم افزار chromas بررسی شد و نتایج در بانک اطلاعاتی NCBI ، Blast شد و alignment انجام شد.



تصویر ۳-۶ دستگاه تعیین توالی مورد استفاده در مطالعه حاضر (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer)

۳-۲-۹ روش تجزیه و تحلیل داده ها:

پس از جمع آوری داده ها، یافته ها به وسیله آخرین ویرایش نرم افزار spss (آخرین ویرایش ۲۲) تجزیه و تحلیل شد. بعد از وارد کردن داده ها به نرم افزار از آزمون های آمار توصیفی، آزمون آماری Binomial (۲ جمله ای) و ZTest و آزمون Crosstabs برای محاسبه حساسیت و ویژگی آزمایش استفاده شد. مقدار P value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

فصل چهارم

یافته ها

۴-۱ نتایج جمع آوری و تفکیک نمونه ها:

تعداد ۱۱۰ بلوک فیکس شده با فرمالین و محصور در پارافین مربوط به نمونه های بیوپسی دهانه رحم از آرشیو پاتولوژی بیمارستان کوثر قزوین مربوط به ۱۰ سال اخیر به همراه جواب بافت شناسی آنها و تشخیص پاتولوژی جمع آوری شد. پس از بررسی نمونه ها و حذف موارد تکراری ، نمونه های بدون گزارشات پرونده ای و مواردی که در گزارشات پرونده ای آنها نقص وجود داشت از مطالعه ، تعداد ۱۰۰ بلوک به مرحله برش وارد شدند.

بلوک ها بر اساس جواب های پرونده ای به ۳ دسته اصلی تقسیم بندی شدند، این دسته بندی عبارت است از: دسته اول بلوک های با تشخیص سالم^۱ (بدون تغییرات نئوپلاستیک و دیسپلاستیک^۲) به عنوان گروه کنترل ، بلوک های با تشخیص سرطان دهانه رحم (موارد SCC^۳ و AC^۴) و بلوک های با تشخیص مراحل پیش سرطانی^۵ گروه سرطانی خود شامل سرطان های نوع SCC و AC بود و بلوک های پیش سرطانی شامل بلوک های بافتی با تشخیص تغییرات Koilocytic و مرحله دیسپلازی Intraepithelial lesions که خود شامل بلوک های با تشخیص HSIL^۶ و LSIL^۷ بودند.

¹ Normal

² non dysplastic - non neoplastic

³ Squamous cell carcinoma

⁴ Adenocarcinoma

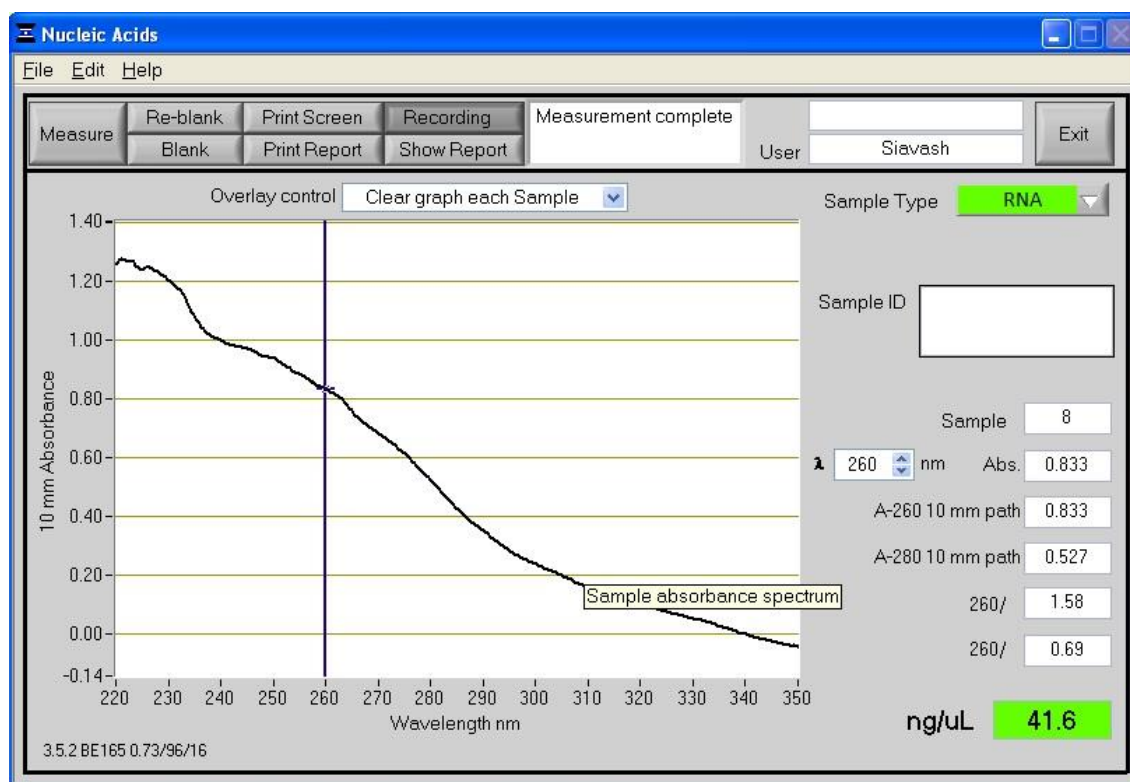
⁵ premalignant

⁶ High grade squamous intraepithelial lesions

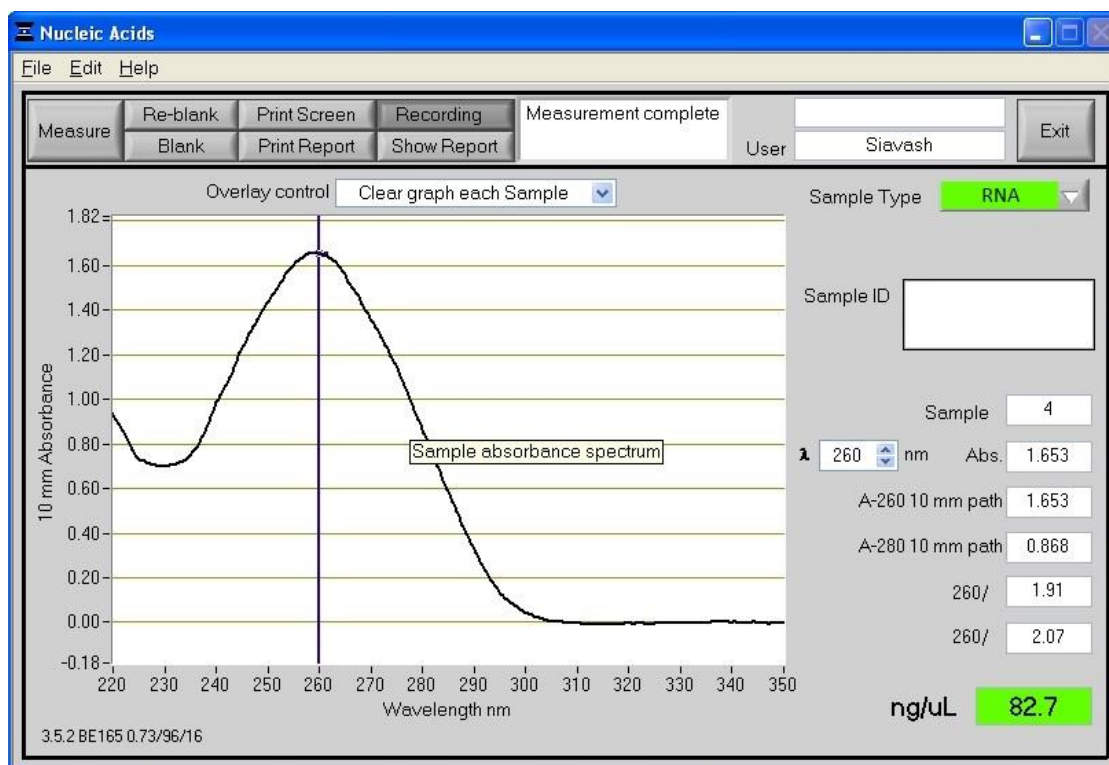
⁷ Low grade squamous intraepithelial lesions

از بلوک های وارد شده به مرحله برش ، تعداد ۲۵ بلوک مربوط به گروه کنترل (سالم) ، ۵۰ عدد مربوط به پیش سرطان و تعداد ۲۵ نمونه مربوط به بلوک های با تشخیص سرطان بود.

تعداد ۷ نمونه بافتی در مرحله برش (به علت اتمام بافت) و مرحله استخراج (از دست رفتن نمونه در حین استخراج یا نداشتن کیفیت لازم نمونه استخراج شده در آزمون نانودراپ و عدم امکان استخراج مجدد) حذف شدند که در نهایت ۲۴ نمونه کنترل، ۴۴ نمونه پیش سرطان و ۲۵ نمونه سرطانی به مرحله کنترل کیفیت استخراج با ژن ACTB راه یافتند.



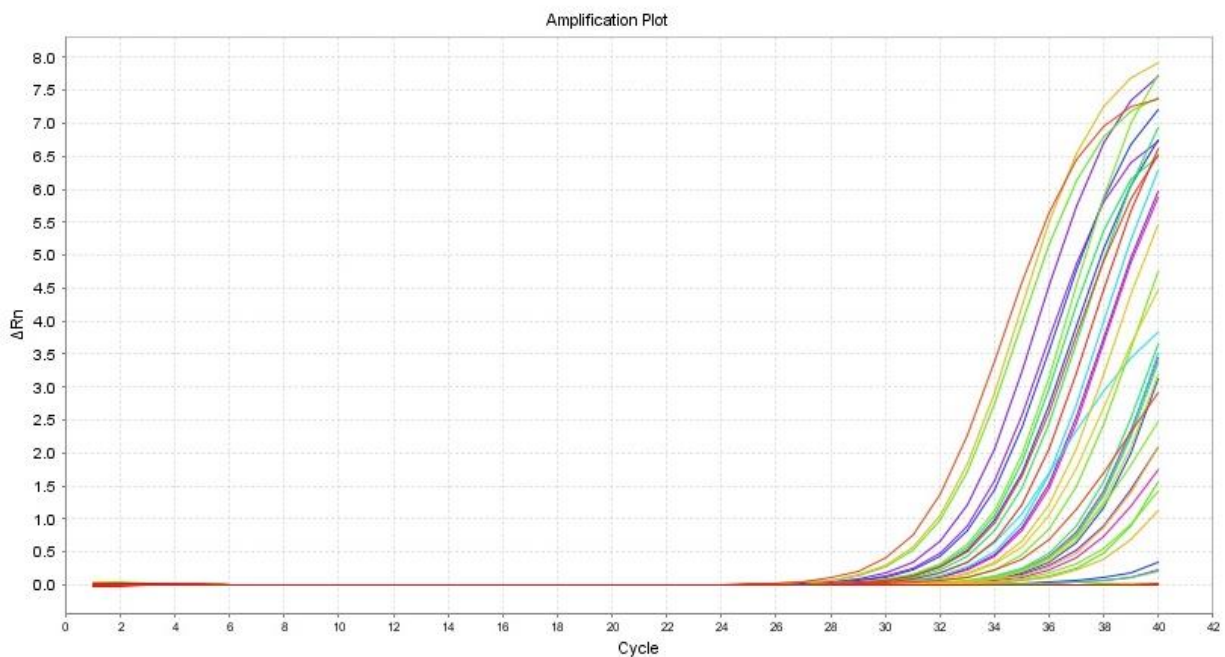
تصویر ۴-۱ یک نمونه از نانودراپ محصولات حاصل از استخراج با کیفیت غیر قابل قبول



تصویر ۲-۴ یک نمونه از نانودراپ محصولات حاصل از استخراج با کیفیت قابل قبول

۲-۴ نتایج کنترل کیفیت استخراج نمونه ها:

در مرحله کنترل کیفیت استخراج با ژن ACTB تمام نمونه های کنترل (هر ۲۴ نمونه) از نظر کنترل کیفیت استخراج تایید شدند، با توجه به عدم بیان ژن Actin Beta در ۷ نمونه از ۴۴ نمونه پیش سرطان و ۳ نمونه از ۲۵ نمونه سرطانی تعداد نمونه های وارد شده به مرحله بیان ژن P16INK4a عبارت بود از : ۲۴ نمونه نرمال ، ۳۷ نمونه پیش سرطان و ۲۲ نمونه سرطانی که این نمونه ها با توجه به تایید کیفیت استخراج و تایید قابلیت انجام آزمایش Real Time PCR به مرحله بررسی بیان ژن راه یافتند.



تصویر ۳-۴ منحنی تکثیر برای ژن خانه دار بتا اکتین (ACTB House keeping) در کنار کنترل منفی

جدول ۱-۴ فراوانی نمونه های راه یافته به مرحله بیان ژن به تفکیک گروه پاتولوژی

گروه	N
نرمال	۲۴
تغییرات Koilocytic	۲۴
Squamous Intraepithelial Lesions	۱۳
سرطانی	۲۲
جمع	۸۳

۳-۴ نتایج بررسی بیان ژن P16INK4a

بررسی بیان ژن P16INK4a بر روی این ۸۳ نمونه که از نظر کیفیت استخراج و ساخت cDNA تایید شده بودند انجام گرفت که، تعداد ۳ نمونه از ۲۴ نمونه نرمال (دوازده و نیم درصد) تعداد ۱۴ نمونه از ۳۷ نمونه پیش سرطانی (۳۸ درصد) شامل ۳۳ درصد موارد التهابی با تشخیص Koilocytic changes ، و همچنین ۶ نمونه از ۱۳ نمونه (۴۶ درصد) Squamous intraepithelial lesion (شامل ۴۰ درصد موارد LSIL و ۶۷ درصد موارد HSIL) همچنین تعداد ۱۲ نمونه از ۲۲ نمونه سرطانی (۵۵ درصد) ژن مورد نظر را بیان کردند.

جدول ۲-۴ فراوانی نمونه های مثبت و منفی از نظر حضور ژن P16INK4a به تفکیک گروه پاتولوژی

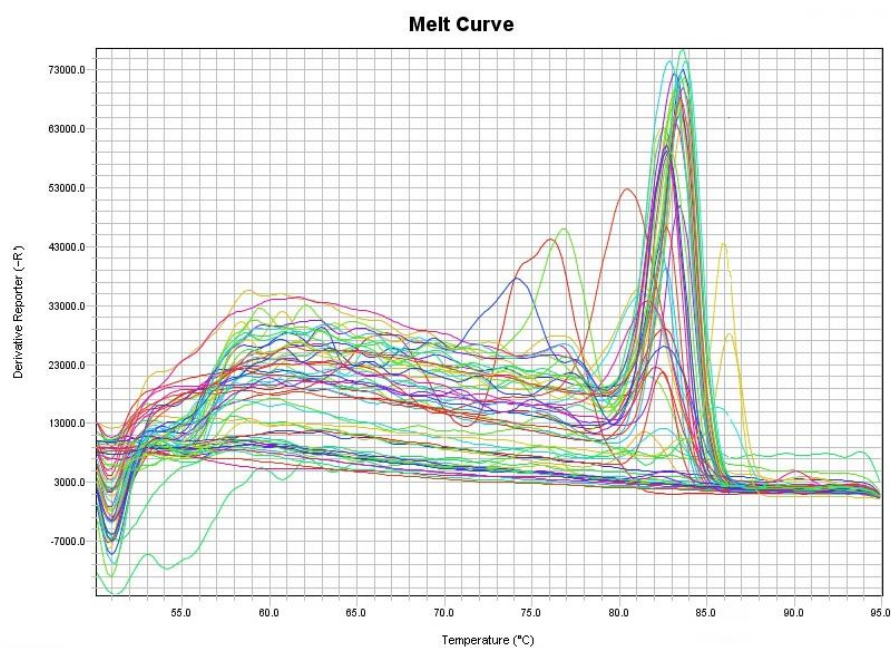
گروه	مثبت (N)	(%) مثبت	منفی (N)	(%) منفی	P value
نرمال	۳/۲۴	۱۲/۵	۲۱/۲۴	۸۷/۵	
تغییرات Koilocytic	۸/۲۴	۳۳	۱۶/۲۴	۶۷	۰/۰۰۷
Squamous intraepithelial lesions	۶/۱۳	۴۶	۷/۱۳	۵۴	۰/۰۰۳
سرطان	۱۲/۲۲	۵۵	۱۰/۲۲	۴۵	۰/۰۰۰

۴-۴ نتایج بررسی کمی بیان ژن P16INK4a

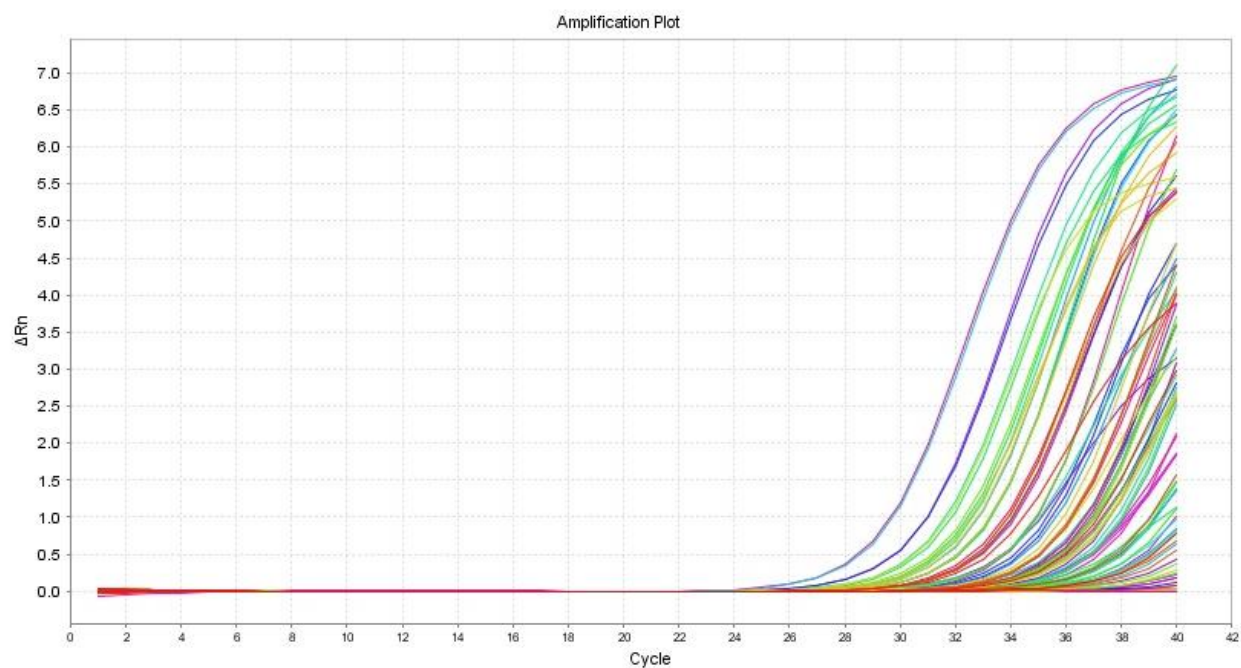
نمونه هایی که از نظر بیان ژن P16INK4a مثبت گزارش شدند وارد مرحله محاسبات کمی برای بررسی میزان نسبی بیان این ژن شدند. لیست این نمونه ها همراه با اختلاف (Δ) سیکل آستانه (Ct) ژن P16INK4a با ژن ACTB به همراه تشخیص پاتولوژی و سن هر کدام از بیماران در جدول ۳-۴ آورده شده است.

جدول ۳-۴ داده های ΔCt به همراه تشخیص پاتولوژی و سن بیماران در نمونه های با بیان P16INK4a

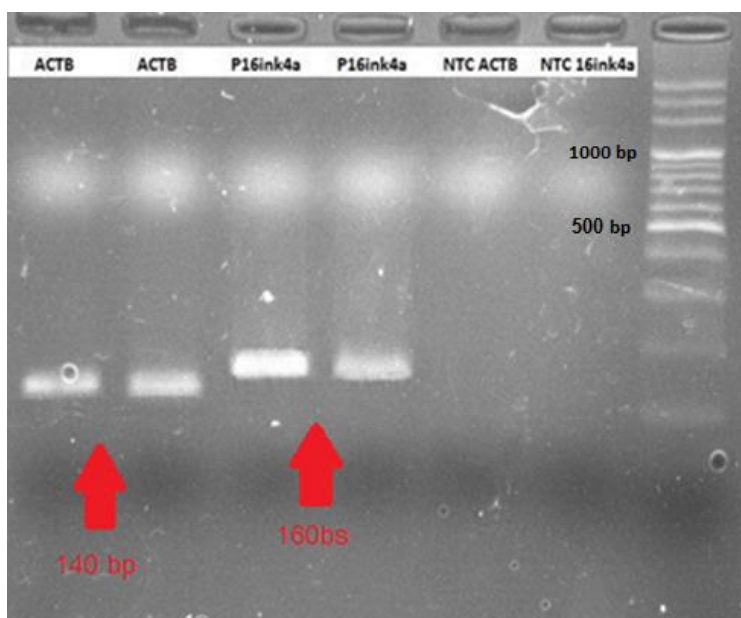
Case	Age	diagnosis	ΔCt	Case	Age	Diagnosis	ΔCt
1	63	Adenocarcinoma	4.08	16	65	LSIL	3.93
2	44	Adenocarcinoma	3.79	17	47	LSIL	2.69
3	31	squamous cell carcinoma	4	18	52	LSIL	3.73
4	63	squamous cell carcinoma	4.97	19	43	Koilocytic changes	9.16
5	54	squamous cell carcinoma	1.67	20	40	Koilocytic changes	6.6
6	58	squamous cell carcinoma	2.8	21	26	Koilocytic changes	4.01
7	69	squamous cell carcinoma	1.93	22	47	Koilocytic changes	3.66
8	49	squamous cell carcinoma	3.09	23	51	Koilocytic changes	6.58
9	66	squamous cell carcinoma	3.69	24	37	Koilocytic changes	2.79
10	60	squamous cell carcinoma	1.18	25	28	Koilocytic changes	6.95
11	32	squamous cell carcinoma	2.83	26	27	Koilocytic changes	3.49
12	41	squamous cell carcinoma	1.77	27	43	Normal	2.12
13	36	HSIL	4.68	28	45	Normal	8.8
14	39	HSIL	3.46	29	43	Normal	5.79
15	42	LSIL	4.3				



تصویر ۴-۴ نمودار ذوب برای ژن های P16INK4a و ACTB در واکنش Real Time PCR



تصویر ۴-۵ منحنی تکثیر برای ژن های P16INK4a و ACTB در واکنش Real Time PCR

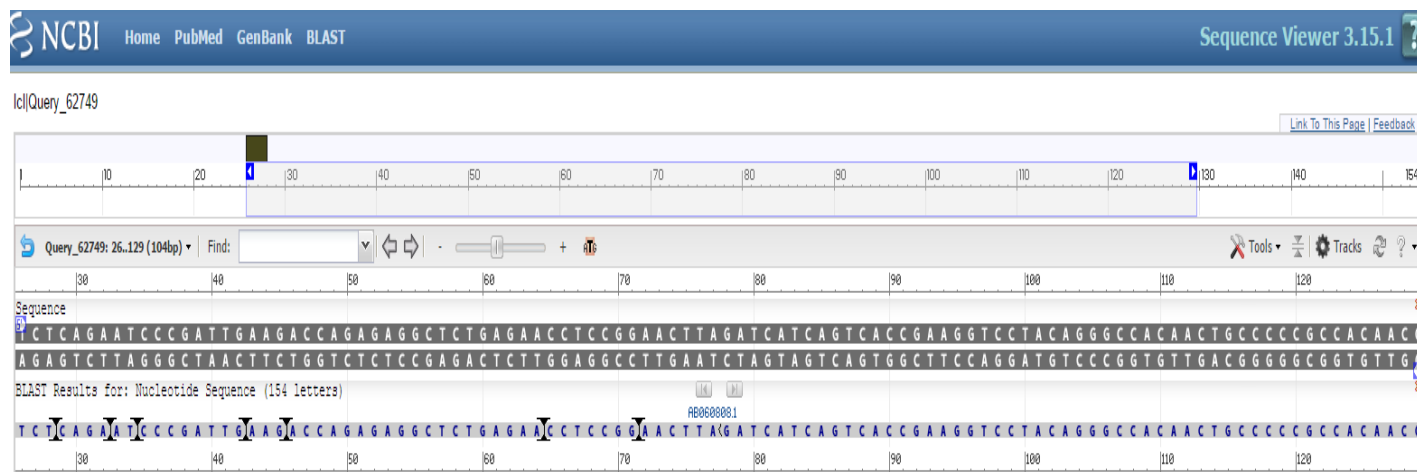


تصویر ۴-۶ الکتروفورز محصول Real Time PCR برای ژن ACTB و P16INK4a همراه کنترل کنترل منفی

واکنش ها در کنار خط کش نشانگر DNA



تصویر ۴-۷ نمایی از تعیین توالی ژن P16INK4a حاصل از توالی یابی محصولات PCR



تصویر ۴-۸ نمایی از Blast توالی حاصل از توالی یابی محصول PCR ژن P16INK4a در بانک ژنی NCBI

بعد از محاسبه ΔCt برای نمونه هایی که بیان P16INK4a داشتند، میزان بیان این ژن در آنها در مقایسه با ژن رفرانس (ACTB) نسبت به نمونه های سالم (نرمال) از طریق روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد. در جداول زیر فراوانی ، درصد بیان ، ΔCt و میزان افزایش بیان ژن P16INK4a نسبت به گروه نرمال برای گروه های مختلف آورده شده است.

جدول ۴-۴ فراوانی ، درصد بیان و ΔCt در نمونه های کنترل

گروه کنترل	
۲۴	تعداد کل
۳ (۱۲/۵%)	بیان p16
۲۱ (۸۷/۵%)	عدم بیان p16
۵/۵۷	ΔCt

جدول ۵-۴ میزان افزایش بیان ژن P16INK4a در نمونه های Koilocytic بیان کننده این ژن

گروه با تغییرات Koilocytic	
۲۴	تعداد
۸ (۳۳%)	بیان P16
۱۶ (۶۷%)	عدم بیان P16
۵/۴۰۸۸۶۶۴۰۵	ΔCt
-۰/۱۶۵۸۹۹۷۵۴	$\Delta\Delta Ct$
۱/۱۲	افزایش بیان (N برابر)

جدول ۴-۶ میزان افزایش بیان ژن P16INK4a در نمونه های Intraepithelial Lesions بیان کننده این ژن

گروه Intraepithelial Lesions	
تعداد نمونه	۱۳
بیان P16	۶ (۴۶٪)
عدم بیان P16	۷ (۵۴٪)
ΔCt	۳/۸۰۳۳۴۷۶
$\Delta\Delta Ct$	-۱/۷۷۱۴۱۸۶
افزایش بیان (N برابر)	۳/۴۲

جدول ۴-۷ میزان افزایش بیان ژن P16INK4a در نمونه های LSIL بیان کننده این ژن

گروه LSIL	
تعداد نمونه	۱۰
بیان P16	۴ (۴۰٪)
عدم بیان P16	۶ (۶۰٪)
ΔCt	۳/۶۶۸۲۹۸۷۲۱
$\Delta\Delta Ct$	-۱/۹۰۶۴۶۷۴۳۸
افزایش بیان (N برابر)	۳/۷۴

جدول ۴-۸ میزان افزایش بیان ژن P16INK4a در نمونه های HSIL بیان کننده این ژن

گروه HSIL	
تعداد نمونه	۳
بیان P16	۲ (۶۶/۶۶%)
عدم بیان P16	۱ (۳۳/۳۳%)
ΔCt	۴/۰۷۳۴۴۵۳۲
$\Delta\Delta Ct$	-۱/۵۰۱۳۲۰۸۳۹
افزایش بیان (N برابر)	۲/۸۳

جدول ۴-۹ میزان افزایش بیان ژن P16INK4a در نمونه های سرطانی بیان کننده این ژن

گروه سرطانی	
تعداد	۲۲
بیان P16	۱۲ (۵۵%)
عدم بیان P16	۹ (۴۵%)
ΔCt	۲/۹۸۷۵۰۰۳۵
$\Delta\Delta Ct$	-۲/۵۸۷۲۶۵۸۰۹
افزایش بیان (N برابر)	۶/۰۱

جدول ۴-۱۰ میزان افزایش بیان در ژن P16INK4a نسبت به گروه کنترل به تفکیک گروه های پاتولوژی

گروه	میزان افزایش در بیان (N برابر)	P value
Koilocytic تغییرات	۱/۱۲	۰/۰۰۷
Squamous Intraepithelial lesions	۳/۴۲	۰/۰۰۳
سرطانی	۶/۰۱	۰/۰۰۰

۴-۵ نتایج محاسبه حساسیت و اختصاصیت آزمایش

با در نظر گرفتن گزارشات پرونده ای پاتولوژی به عنوان Gold Standard حساسیت، ویژگی ، ارزش اخباری مثبت ، ارزش اخباری منفی و دقت آزمایش بیان ژن P16INK4a با روش مورد استفاده در این مطالعه، برای هر یک از گروه های مورد بررسی به عنوان یک تست آزمایشگاهی بررسی شد.

جدول ۴-۱۱ حساسیت، ویژگی و دقت تست P16INK4a به روش Real Time PCR در تشخیص

گروه دارای تغییرات koilocytic در مقایسه با پاتولوژی (Gold Standard)

حساسیت	۳۳/۳%
ویژگی	۸۷/۵%
ارزش اخباری مثبت	۷۲/۷%
ارزش اخباری منفی	۵۶/۸%
دقت	۶۰%

جدول ۴-۱۲ حساسیت، ویژگی و دقت تست P16INK4a به روش Real Time PCR در تشخیص

گروه لزیون های اسکوآموس داخل اپیتلیالی در مقایسه با پاتولوژی (Gold Standard)

حساسیت	۴۶/۲%
ویژگی	۸۷/۵%
ارزش اخباری مثبت	۶۶/۷%
ارزش اخباری منفی	۷۵%
دقت	۷۲/۹%

جدول ۴-۱۳ حساسیت، ویژگی و دقت تست P16INK4a به روش Real Time PCR در تشخیص

گروه LSIL در مقایسه با پاتولوژی (Gold Standard)

حساسیت	۴۰%
ویژگی	۸۷/۵%
ارزش اخباری مثبت	۵۷/۱%
ارزش اخباری منفی	۷۷/۸%
دقت	۷۳/۵%

جدول ۴-۱۴ حساسیت، ویژگی و دقت تست P16INK4a به روش Real Time PCR در تشخیص

گروه HSIL در مقایسه با پاتولوژی (Gold Standard)

حساسیت	۶۶/۷%
ویژگی	۸۷/۵%
ارزش اخباری مثبت	۴۰%
ارزش اخباری منفی	۹۵/۵%
دقت	۸۵/۲%

جدول ۴-۱۵ حساسیت، ویژگی و دقت تست P16INK4a به روش Real Time PCR در تشخیص

گروه سرطانی در مقایسه با پاتولوژی (Gold Standard)

حساسیت	۵۴/۵%
ویژگی	۸۷/۵%
ارزش اخباری مثبت	۸۰%
ارزش اخباری منفی	۶۷/۷%
دقت	۷۱/۷%

جدول ۴-۱۶ حساسیت، ویژگی و دقت تست P16INK4a به روش Real Time PCR به صورت

جامع با در نظر گرفتن تمام گروه ها در مقایسه با پاتولوژی (Gold Standard)

حساسیت	۴۴/۱%
ویژگی	۸۷/۵%
ارزش اخباری مثبت	۸۹/۷%
ارزش اخباری منفی	۳۸/۹%
دقت	۵۶/۶%

فصل پنجم

بہشت و نسیجہ گیری

۵- ابعث:

یکی از اصلی ترین و مهم ترین بیماری هایی که تشخیص آن امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است انواع سرطان است. تشخیص سرطان دهانه رحم نیز به عنوان دومین سرطان شایع در زنان و با توجه به هزینه های تحمیلی کلان اجتماعی و اقتصادی به جامعه و سیستم بهداشتی امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

با توجه به اینکه سرطان دهانه رحم دارای سیری طولانی و پیشرفتی آهسته می باشد، می توان با تشخیص زود هنگام آن به خصوص در مراحل پیش سرطانی به کاهش مرگ و میر ناشی از این سرطان مهم کمک شایانی کرد. روش های فعلی برای غربالگری، تشخیص و پیگیری این بیماری بر پایه روش های سایتولوجژی و هیستولوجژی می باشد که از سالیان پیش (به عنوان مثال پاپ اسمیر: دهه ۲۰ قرن گذشته) مورد استفاده قرار گرفته است و بدون تغییر می باشد و با توجه به محدودیت های این روش ها از جمله عدم حساسیت کافی در یک بررسی و نیاز به بررسی های مکرر و وابستگی بسیار زیاد به مهارت فردی و شرایط نمونه گیری (۲۶) و همچنین با تکیه بر اصل افزایش شناخت ما از این بیماری و شناخت علل ایجاد و پیشرفت آن (که در مقدمه به آن اشاره شد)، ابداع و توسعه روش های تشخیصی جدید به عنوان مکمل یا حتی جایگزین برای روش های مورد استفاده فعلی موضوع فعالیت بسیاری از پژوهشگران این حوزه قرار گرفته است، به خصوص استفاده از بیومارکر های اختصاصی ویروسی (E6-E7 mRNA Detection) و بیومارکر های میزبانی (نظیر P16INK4a, KI67, P16ARF و...) که در مقدمه به آنها به طور کامل اشاره شد.

از جمله چالش برانگیز ترین و جنجالی ترین این روش های نوظهور، بیان ژن سرکوب کننده تومور P16INK4a و یا حضور محصولات پروتئینی آن در بافت دهانه رحم می باشد که با توجه به ارتباط اختصاصی

میان افزایش در بیان این ژن و سرطان دهانه رحم؛ در سال های اخیر بسیار مورد توجه پژوهشگران این حوزه بوده است. پروتئین P16INK4a در بسیاری از سرطان ها به واسطه ی جهش ها و حذف ژن و یا هایپر متیلاسیون غیر فعال می گردد، اما در سرطان دهانه رحم افزایش بیان P16INK4a به ویژه در نتیجه غیر فعال سازی عملکرد پروتئین Rb در واکنش با پروتئین E7 ویروس HPV رخ می دهد (۲۶، ۳۵-۴۰، ۴۶، ۴۸).

مطالعات گوناگون روش های مختلفی را برای بررسی بیان این ژن و بررسی حضور محصولات پروتئینی آن مورد استفاده قرار داده اند که بیشتر تمرکز بر روی روش های کیفی بافت شناسی از جمله ایمونو هیستوشیمی بوده است و مطالعات با روش های کمی از جمله با روش Real time PCR در این زمینه بسیار اندک می باشد. با توجه به اصل کمی بودن این متغیر (بیان ژن) و از آنجا که روش های ایمونو هیستوشیمی کیفی بوده و دقت انجام آزمایش به مهارت فرد وابستگی زیادی دارد لذا در این مطالعه استفاده از روش کمی Real-Time PCR در دستور کار قرار گرفت. همچنین گزارشات در این زمینه از کشورمان ایران بسیار اندک است و بر اساس اطلاع پژوهشگران، تا این لحظه هیچ گزارشی در این زمینه از ایران با روش Real Time PCR در ایران ارائه نشده است.

بسیاری از مطالعات همانگونه که در فصل مرور منابع نیز به تعدادی از آنها اشاره شد افزایش در بیان P16INK4a را در طی روند پیشرفت بیماری به سمت سرطان دهانه رحم تایید می کنند. هرچند که درصد های گوناگونی برای هر یک از مراحل سالم، پیش سرطانی و سرطانی در مطالعات گوناگون ارایه شده است. در پاره ای از مطالعات ثابت شده است بیمارانی که دارای افزایش در بیان پروتئین P16INK4a می باشند در مقایسه با بیمارانی که فاقد این افزایش در بیان هستند در دوره کوتاه تری سیر پیشرفت بیماری تا شکل گیری سرطان دهانه رحم را طی می کنند، بنابر این افزایش در بیان این پروتئین در تعقیب روند و سیر پیشرفت سرطان دهانه رحم می تواند

مورد استفاده قرار گیرد (۴۹). با توجه به اینکه پروتئین P16INK4a یک سرکوب کننده تومور می باشد (۱) و در بافت های بدون تغییرات نئوپلاستیک و دیسپلاستیک دهانه رحم به ندرت و به میزان بسیار اندک و تنها در شرایط خاصی نظیر استرس های سلولی در برخورد با میتوزن ها یا پیری ظاهر می شود (۴۸،۱) در تقریباً تمامی مطالعات میزان این پروتئین در بافت نرمال صفر یا نزدیک به صفر گزارش شده است، از جمله در مطالعه مربوط به Volgareva و همکاران (۳۶) و مطالعه Chin Tan و همکاران (۴۳) P16INK4a در نمونه های نرمال مشاهده نشده است، در مطالعه دیگری Queiroz و همکاران (۴۱) ۹ درصد از نمونه های نرمال از نظر P16INK4a مثبت گزارش شده است و یا در مطالعه Gupta و همکاران (۴۴) حضور P16INK4a در نمونه های نرمال ۱۰ درصد بوده است، در مطالعه Wang و همکاران (۴۹) و همچنین مطالعه شربتداران و همکاران (۴۰) این رقم در نمونه های نرمال ۱۲/۵ درصد گزارش شده است این رقم در مطالعه ما ۱۲/۵ درصد گزارش شد. با توجه به اینکه حضور و افزایش در بیان ژن P16INK4a می تواند در مواردی نظیر پیری یا استرس های سلولی نیز رخ دهد، پژوهشگران احتمال تغییراتی از این دست را برای موارد مثبت در این گروه در نظر گرفتند. در مورد نمونه های دارای تغییرات Koilocytic مطالعاتی محدودی در دسترس پژوهشگران بود به عنوان مثال Volgareva و همکاران (۳۶) رقم ۱۰ درصد را برای حضور P16INK4a در نمونه های دارای Koilocytosis گزارش کردند. در مطالعه دیگری Godoy و همکارانش (۵۰) این درصد را برای نمونه های Koilocytic ۴۷/۵ درصد گزارش کردند. در مطالعه ما ۳۳ درصد موارد Koilocytic از نظر حضور پروتئین P16INK4a مثبت شدند.

در مورد نمونه های Squamous intraepithelial lesions (S.I.L) میزان موارد گزارش شده ی مثبت P16INK4a در مطالعه ی ما ۴۶ درصد بود که این میزان در مطالعه ی شربتداران و همکاران ۶۳/۳٪ گزارش شده است.

این گروه (S.I.L) خود شامل دو زیر گروه (LSIL) Low squamous intraepithelial Lesions و High squamous intraepithelial lesions (HSIL) می باشد که در مورد LSIL با توجه به مطالعات گوناگون درصد های مختلفی در مقالات گزارش شده است. در مورد گروه LSIL در مطالعه Lambert و همکاران (۳۷) ۳۳ درصد موارد، در مطالعه ی Volgareva و همکاران (۳۶) ۳۷ درصد موارد ، در مطالعه ی Gajanin و همکاران (۴۷) ۴۳ درصد موارد ، Queiroz و همکاران (۴۱) ۶۰ درصد موارد از نظر P16INK4a مثبت گزارش شدند. در مورد مطالعه ما این رقم ۴۰ درصد بود.

در مورد گروه نمونه های HSIL و سرطانی در اکثریت مقالات حضور ۷۵ تا ۱۰۰ درصدی برای پروتئین P16INK4 در نمونه های HSIL و سرطان گزارش شده است که این اعداد در مورد مطالعه حاضر ۶۷ درصد موارد HSIL و ۵۵ درصد موارد سرطانی بود (۴۱,۴۹).

علت اینکه درصد حضور P16INK4a در مطالعه حاضر کمتر از سایر مطالعات می باشد می تواند مرتبط با این واقعیت باشد که در یک بیمار ممکن است در نواحی مختلف سرویکس طیفی از تغییرات پاتولوژیک از حالت نرمال تا متاپلازی و درجات مختلف دیزپلازی وجود داشته باشد که حضور این موارد در کنار هم در یک منطقه امکان ایجاد خطاهای تصادفی احتمالی در نمونه برداری را ایجاد کرده و می تواند بر نتایج مطالعه تاثیرگذار باشد (۴۰).

همچنین می تواند مرتبط با این نکته باشد که امروزه اثبات شده است که در اغلب موارد، در صورت آلودگی بافت دهانه رحم با High Risk HPV در مراحل پیش رفته پیش سرطانی و سرطان حضور پروتئین سرکوب کننده تومور P16INK4a مورد انتظار است و در بدخیمی ها و سرطان های دهانه رحم غیر مرتبط با HPV و یا ناشی از Low Risk HPV وجود P16INK4a انتظار نمی رود (NHS2012) (۳۶، ۳۷، ۳۹، ۴۱، ۴۳، ۴۶، ۵۰، ۵۱) بنابر این با توجه به اینکه اولاً در پژوهش حاضر هیچ گونه غربالگری از نظر آلودگی با ویروس HPV و یا آلودگی با تیپ های پر خطر یا کم خطر آن صورت نگرفته است، و ثانیاً اینکه همواره درصدی از بدخیمی های دهانه رحم بدون آلودگی با HPV و یا بدون حضور تیپ های پر خطر آن روی می دهد بنابر این، اختلاف میان گزارشات مختلف با هم و با این گزارش مورد انتظار پژوهشگران بوده است.

در زمینه ی گزارش کمی میزان افزایش در بیان ژن P16INK4a در نمونه های نرمال ، پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم مطالعات بسیار اندکی در دسترس است و این موضوع هنوز به خوبی روشن نشده است. به ویژه اینکه تا این لحظه بر اساس اطلاع پژوهشگران هیچ گونه آمار و اطلاعاتی در این باره در مورد جامعه ایرانی در دسترس نمی باشد. بیشترین آمار و اطلاعات در این زمینه مربوط به مطالعاتی است که از روش ایمونوهیستوشیمی و آنتی بادی منوکلونال برای شناسایی محصول ژن P16INK4a در بافت استفاده کرده اند و نتیجه را یا به صورت کیفی (حضور یا عدم حضور) و یا به صورت نیمه کمی^۱ گزارش کرده اند. مطالعاتی که میزان بیان این ژن را در سیر پیشرفت بیماری از حالت نرمال تا سرطانی با روش کمی Real Time PCR بررسی کرده باشند بسیار محدود می باشد، تنها یک مطالعه در این زمینه در دسترس پژوهشگران بود که در آن Keyserling و همکاران (۴۵) در قسمتی از مطالعه خود با روش Real Time PCR با کار بر روی ۴۵ نمونه HSIL و HPV+ پاپ

¹ semi quantitative

اسمیر و مقایسه آنها از نظر میزان افزایش بیان P16INK4a با ۴۸ نمونه نرمال، میزان افزایش بیان ۶/۲۷ برابر را در نمونه های HSIL گزارش کرد که این عدد در مطالعه ما ۳/۷۴ برای LSIL ها و ۲/۸۳ برای نمونه های HSIL بود.

با توجه به نتایج مطالعات ایمونوهیستولوژی دیگر و نزدیکی نتایج HSIL به گروه سرطانی در آنها و همچنین قرابت این دو گروه از منظر پاتولوژی و سیر پیشرفت بیماری، برای افزایش بیان در گروه HSIL عددی بزرگتر از ۲/۸۳ و در بازه ی بین ۳/۷۴ (میزان افزایش بیان در گروه LSIL) و ۶/۰۱ (میزان افزایش بیان در گروه سرطانی) مورد انتظار پژوهشگران بود. با توجه به اینکه در مطالعه ما از بافت های فیکس شده پارافینه آرشیوی به جای نمونه پاپ اسمیر استفاده شده است احتمال از دست رفتن مقادیر قابل توجهی mRNA در طی پروسه فیکساسیون و نگهداری بافت یا در طی مراحل دشوار استخراج mRNA از بافت فیکس شده (با توجه به حساسیت و شکنندگی بسیار بالای مولکول RNA) می تواند مورد توجه قرار گیرد. همچنین احتمال مخلوط شدن این نمونه ها با بافت نرمال هنگام نمونه برداری بیوپسی باید مورد توجه قرار گیرد. در ضمن با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تنها ۲ نمونه HSIL به مرحله بررسی افزایش بیان ژن P16INK4a ورود پیدا کردند، باعث عدم اطمینان به نتایج این گروه خواهد شد.

همانطور که اشاره شد تقریباً در بین تمام مطالعات صورت گرفته در این زمینه در مورد افزایش بیان این ژن (P16INK4a) با ایجاد و پیشرفت بدخیمی و حرکت به سمت سرطان نسبت به حالت نرمال اتفاق نظر وجود دارد اما میزان کمی افزایش بیان این ژن در هر مرحله از سیر بیماری هنوز مبهم است و اطلاعات کافی در مورد آن موجود نیست.

در مطالعه حاضر که یک مطالعه Real Time PCR نسبی بود، تغییرات در بیان ژن هدف P16INK4a نسبت به ژن مرجع در نظر گرفته شده برای این مطالعه (ACTB) در گروه های مورد آزمایش شامل مراحل پیش سرطانی (Koilocytic Changes و High and Low grade squamous intraepithelial lesions) و مرحله سرطان (شامل SCC و AC) در مقایسه با میزان بیان همین ژن نسبت به ژن مرجع در بافت های نرمال محاسبه شد.

در مرحله تغییرات Koilocytic که مرحله آغازین تغییراتی است که می تواند در نهایت بعد از سال ها منجر به سرطان دهانه رحم شود و در حقیقت اولین و اصلی ترین نشانه برای آلودگی بافت سالم و سلول های نرمال با ویروس HPV می باشد بیان ژن P16INK4a افزایش بیان بسیار بسیار اندکی (۱/۱۲ برابر) نسبت به نمونه های نرمال نشان می دهد.

این میزان افزایش اندک در ۳۳٪ از نمونه های این گروه را می توان اینطور تفسیر کرد که با توجه به آلودگی اخیر هنوز ادغام ژن های E6 و E7 در داخل ژنوم میزبان رخ نداده است یا هنوز سکانس E5 ویروسی در اثر ادغام در ژنوم میزبان شکسته نشده است تا شاهد برداشته شدن کنترل از روی ژن های E6 و E7 و بیان بسیار بالای آنها و وقایع بعدی که منجر به افزایش بیان ژن P16INK4a می شود باشیم.

با ادامه سیر بیماری به سمت سرطان مرحله تغییرات دیسپلاستیک بافتی آغاز می شود. در این مرحله بیان ژن P16INK4a افزایشی ۳/۴ برابری نسب به حالت نرمال از خود نشان می دهد. می توان گفت در این مرحله فاز لیزوژنی ویروس به طور کامل اتفاق افتاده است و با بیان بیش از حد و خارج از کنترل ژن E7 ویروسی ادغام شده در میزبان و اتصال محصولات آن به پروتیین رتینوبلستوما (Rb) شاهد افزایش بیان ۳/۴ برابری P16INK4a نسبت به نمونه های نرمال بوده ایم.

گاهی این ضایعات در روندی معکوس به سمت بهبودی پیش می روند اما در صورتی که بیماری ادامه پیدا کند و سیستم ایمنی نیز قادر به سرکوب آن نباشد سرطان دهانه رحم ایجاد می شود. در این مرحله میزان بیان ژن P16INK4a باز هم افزایش نشان داده و در مطالعه حاضر در نمونه های سرطانی که این ژن در آنها بیان شده است، افزایش بیان ۶ برابری نسبت به نمونه های نرمال مشاهده شد. این نتایج می تواند تایید کننده نتیجه مطالعاتی باشد که بیشترین میزان بیان نیمه کمی (+++) ژن P16INK4a را در مرحله سرطان گزارش کرده اند از جمله مطالعه انجام گرفته توسط Wang و همکاران (۴۹) و همچنین مطالعه انجام گرفته توسط Lambert و همکاران (۳۷) و Queiroz و همکاران (۴۱).

با توجه به افزایش ۶,۰۱ برابری بیان این ژن در نمونه های سرطانی، احتمالاً این مرحله باید آخرین مرحله افزایش بیان این ژن و بالاترین بیان ژن P16INK4a و حضور محصولات پروتئینی آن در بافت دهانه رحم باشد چرا که در مطالعه ای که توسط Kanao و همکارانش (۵۱) بر روی نمونه های Stage های مختلف سرطان دهانه رحم صورت گرفت هیچگونه ارتباط معناداری میان بیان ژن P16INK4a با Stage های مختلف سرطان دهانه رحم مشاهده نشده است. (رجوع شود به Stage ها در مقدمه).

در این مطالعه حساسیت، ویژگی و دقت آزمایش بیومارکر P16INK4a به ترتیب عبارت بود از: ۵۴/۵، ۸۷/۵، ۷۱/۷ درصد در تشخیص موارد سرطانی، ۴۶/۲، ۸۷/۵ و ۷۲/۹ درصد در تشخیص لزیون های اسکوآموس داخل اپیتلیالی (۶۶/۷، ۸۷/۵، ۷۱/۷ برای نمونه های HSIL و ۴۰، ۸۷/۵، ۷۳/۵ برای نمونه های LSIL) همچنین ۳۳/۳، ۸۷/۵، ۶۰ درصد در تشخیص بافت های دارای تغییرات Koilocytic. در مطالعات انجام شده گذشته بر روی بیومارکر P16INK4a حساسیت ۵۶ تا ۹۲/۳ درصدی، ویژگی ۶۰ تا ۱۰۰ درصدی، ارزش اخباری مثبت ۷۹ تا ۱۰۰ درصدی و ارزش اخباری منفی ۷۵ تا ۹۸/۳ درصدی گزارش شده است. شربتداران و همکاران (۴۰)

در ایران در مطالعه ای که با روش ایمونوهیستوشیمی انجام شده بود حساسیت ۸۳/۳٪ و ویژگی ۸۰٪ را در وضعیت سرطانی گزارش کردند که حساسیت در آن مطالعه از مطالعه ما بالاتر اما ویژگی در آن مطالعه از مطالعه ما پایین تر بود. همچنین آنها حساسیت ۶۳/۳ درصدی برای تشخیص دیسپلازی سرویکس گزارش کردند که از مطالعه ما پایین تر می باشد. در مطالعه ای که توسط Meyer و همکاران (۵۲) انجام شد حساسیت و ویژگی در تشخیص تغییرات پاتولوژیک نمونه های سرویکس عبارت بود از ۸۱٪ و ۶۲٪ که در مطالعه ما این ارقام ۴۴/۱٪ و ۸۷/۵٪ گزارش شد. در مطالعه ی دیگری که توسط Holladay و همکاران (۵۳) در کشور امریکا انجام شد حساسیت این بیومارکر در تشخیص دیسپلازی سرویکس ۵۶٪ گزارش شد که در مطالعه ما این رقم ۴۶/۲٪ می باشد.

در مطالعه ما ویژگی این بیومارکر در تشخیص تمامی مراحل پیش سرطان و سرطان از حساسیت آن بیشتر بود و با پیشرفت سیر بیماری به سمت سرطان دهانه رحم به حساسیت و دقت آزمایش افزوده شد. همچنین بالاترین حساسیت به ترتیب در تشخیص موارد HSIL (۶۶/۷٪) و سرطانی (۵۴/۵٪) مشاهده شد و بیشترین دقت در آزمایش در موارد لژیون های دیسپلاستیک (HSIL و LSIL) (۸۵/۲٪ و ۷۳/۵٪) و موارد سرطانی (۷۱/۷٪) مشاهده شد که می تواند نشان دهد بیومارکر P16INK4a دارای حساسیت و ویژگی و دقت خوبی برای تشخیص ضایعات با درجه بالا و سرطان سرویکس می باشد.

همچنین نتایج این مطالعه میانگین سن بیماران با تشخیص سرطان را ۵۲/۵ سال نشان داد، این عدد برای بیماران SIL و Koilocytic changes به ترتیب ۴۶/۸ و ۳۷/۳ سال بود. با توجه به مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان میانگین سن ابتلا به سرطان دهانه رحم در ایران چیزی در حدود ۷/۵ سال از سایر نقاط جهان بیشتر

است. (۳۷, ۴۹) این اختلاف می تواند ریشه در عوامل فرهنگی و بالاتر بودن سن آغاز رابطه جنسی در ایران نسب به سایر نقاط جهان به خصوص امریکای شمالی باشد.

همچنین این اختلاف ۱۵ ساله میان تغییرات ناشی از آلودگی با ویروس HPV تا شکل گیری سرطان دهانه رحم می تواند نشانه ای از سیر آهسته و کند پیشرفت بیماری تا ایجاد سرطان دهانه رحم باشد که فرصت بسیار مناسبی برای تشخیص زودرس و درمان را فراهم می آورد.

۵-۲ نتیجه گیری

با توجه به اطلاعات ضد و نقض و با وجود مطالعات بسیار اندک راجع به میزان کمی بیان ژن P16INK4a در سیر پیشرفت بیماری سرطان دهانه رحم، نتایج به دست از این مطالعه می تواند در راستای شفاف سازی هرچه بیشتر و ابهام زدایی از این موضوع نقش به سزایی داشته باشد، نتایج حاصل از این مطالعه در راستای تایید گزارشات موجود افزایش بیان P16INK4a در سیر پیشرفت سرطان دهانه رحم و همچنین رد گزارشات نشان دهنده کاهش بیان این ژن در سیر پیشرفت سرطان دهانه رحم می باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که حضور پروتئین P16INK4a با افزایش تغییرات پاتولوژیک افزایش می یابد و دقت و ویژگی تعیین بیان این پروتئین به عنوان یک بیومارکر با روش Real-Time PCR از حساسیت آن در تشخیص موارد سرطان و ضایعات اسکوآموس سرویکس بیشتر است

با توجه به بیان P16INK4a در ۵۵ درصد موارد سرطانی با ۶,۰۱ برابر افزایش بیان، ۴۶ درصد لژیون های اسکوآموس داخل اپیتلیالی با ۳,۴۲ برابر افزایش بیان و ۳۳ درصد بافت های دارای تغییرات Koilocytic با

۱۲، برابر افزایش در بیان و ارتباط معنا دار میان افزایش در بیان این ژن با تغییرات پاتولوژیک لذا تعیین افزایش بیان P16INK4a با روش Real-Time PCR می تواند بیومارکر مناسبی برای تعیین پیش آگهی بیماران و تعیین سیر پیشرفت سرطان دهانه رحم در آنان باشد.

با توجه به اینکه بیان ژن P16INK4a یک متغیر کمی می باشد و اکثریت مطالعات از روش های کیفی و نیمه کمی برای بررسی بیان استفاده کرده بودند، روش کمی Real Time PCR برای بررسی بیان این ژن در مطالعه حاضر انتخاب شد که در این مطالعه ارتباط معنا داری میان پیشرفت وضعیت پاتولوژی از نرمال به سمت سرطانی (پیشرفت سیر بیماری) و افزایش در میزان بیان ژن P16INK4a مشاهده شد. این بیومارکر در موارد بدخیم و پیش بدخیم افزایش قابل ملاحظه ای دارد که بیشترین میزان این افزایش در مرحله سرطان گزارش شد.

از آنجا که با پیشرفت سیر بیماری به سمت سرطان دهانه رحم به حساسیت و دقت آزمایش افزوده شد و بالاترین حساسیت در تشخیص موارد HSIL و سرطانی مشاهده شد و بیشترین دقت در آزمایش در موارد لزیون های دیسپلاستیک (HSIL و LSIL) و موارد سرطانی مشاهده شد می توان گفت بیومارکر P16INK4a دارای حساسیت، ویژگی و دقت خوبی برای تشخیص ضایعات پیش سرطانی با درجه بالا و سرطان سرویکس می باشد و می تواند در امور تشخیصی به ویژه برای شناسایی بیماران دارای درجات بالای لزیون های دیسپلاستیک پیش سرطانی و ضایعات سرطانی و یا برای تایید نتایج آزمایشات تشخیصی اولیه در این بیماران مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به اینکه در مطالعات به این موضوع اشاره شده است که در ضایعات و لزیون های دیسپلاستیک دهانه رحم بیان کننده P16INK4a سرعت پیشرفت به سمت سرطان دهانه رحم بیشتر خواهد بود، استفاده از این بیومارکر می تواند در تریاژ و پیگیری های بعد از تشخیص و درمان در این بیماران نقشی اساسی بازی کند.

۵-۳ پیشنهادات :

با توجه به اینکه بیان ژن P16INK4a یک متغیر کمی می باشد و تنها اعلام حضور آن به روش کیفی در بافت دهانه رحم نمی تواند به طور کامل و واضح شرایط بیمار را توضیح داده و پیش آگهی دهد، بلکه حضور و افزایش در بیان این ژن موضوع مورد توجه در مورد این بیومارکر است ، بنابراین پیشنهاد می شود در آینده تمرکز مطالعات در این زمینه بیشتر به سمت استفاده از روش های کمی مانند Real Time PCR گرایش داشته باشد. همچنین پیشنهاد می شود با توجه به وابستگی روش ایمونوهیستوشیمی به مهارت فردی و توانایی در تمرکز و قوه بینایی فرد آزمایشگر و کیفیت مواد اولیه مورد استفاده (آنتی بادی)، در مطالعات آینده استفاده هرچه بیشتر از روش های کمی مولکولی همچون Real-Time PCR که قابلیت تکرار پذیری بالا و حداقل وابستگی به مهارت های فردی را دارند مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به ارتباط میان افزایش در بیان ژن P16INK4a و آلودگی با تیپ های با ریسک بالای HPV چنانچه در فاز های آینده مطالعه حاضر نیز این موضوع مد نظر پژوهشگران قرار گرفته است، پیشنهاد می شود در مطالعات مشابه، نمونه ها از نظر آلودگی با ویروس HPV و نیز ژنوتایپ های پرخطر آن نیز مورد بررسی قرار گیرند.

با توجه به محدودیت های ذکر شده برای روش فعلی، توجه به سایر بیومارکرهای تشخیصی در سرطان دهانه رحم و انجام مطالعات بیشتر بر روی آنها توصیه می گردد، به خصوص مطالعه بر روی بیومارکر ویروسی E6 و E7 که می تواند با اطمینان بالا نشان دهنده مرحله آغاز بدخیمی و وضعیت بیمار در پیشرفت به سمت سرطان باشد. همچنین پیشنهاد می شود سایر بیومارکرهای سلولی میزبان از جمله P14ARF و KI67 مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

با توجه به اینکه بیومارکر P16INK4a دارای ویژگی، دقت و حساسیت خوبی در تشخیص ضایعات پیش سرطانی با درجه بالا و سرطان سرویکس می باشد و همچنین با توجه به اینکه افزایش بیان آن دارای ارتباط معنی داری با افزایش تغییرات پاتولوژیک در این بیماران می باشد، لذا می تواند در امور تشخیصی به ویژه برای شناسایی بیماران دارای درجات بالای لزیون های دیسپلاستیک پیش سرطانی و ضایعات سرطانی و یا برای تایید نتایج آزمایشات تشخیصی اولیه این بیماران مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به اینکه در مطالعات به این موضوع اشاره شده است که در ضایعات و لزیون های دیسپلاستیک دهانه رحم بیان کننده P16INK4a سرعت پیشرفت به سمت سرطان دهانه رحم بیشتر خواهد بود، استفاده از این بیومارکر می تواند در تریاژ و پیگیری های بعد از تشخیص و درمان در این بیماران برای تعیین روند بیماری نقشی اساسی بازی کند.

منابع و مآخذ :

۱. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al. Molecular Cell Biology, 7. izdaja. Freeman; 2012.
۲. Owen JA, Punt J, Stranford SA. Kuby immunology: WH Freeman New York; 2013.
۳. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology: Elsevier Health Sciences; 2013.
۴. Lamb RA, Krug R, Knipe D. Fields virology, 7. Fields Virology. 2013.
۵. Mohebi R. Human oncogenic viruses: Royan Pajooh; 2011.
۶. Brook G, Butel J, Morse S, Jawetz M. Medical microbiology. Twenty-fourth edition printed in the United State of America; 2016.
۷. A. T, SM. S-K, A. A-H, A. K, B. S. Carcinogenesis: Role of Viruses in Pathogenesis of Cancers. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2013;21(7):252-65.
۸. Gross L. Oncogenic viruses. Oncogenic viruses. 1970(2nd Edit).
۹. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sciences; 2015.
۱۰. Jawetz M, editor Adelberg's Medical microbiology. Twenty-; 2016.
۱۱. Shanson DC. Microbiology in clinical practice: Butterworth-Heinemann; 2014.
۱۲. F. F, M. H. Human Papillomaviruses and Cancer. J Mazand Univ Med Sci. 2013;23(95):458-80.
۱۳. N. B, M. K. Cervical cancer: The preventive role of HPV vaccine. journal of medical faculty of TUMS. 2007;64(12):1-8.
۱۴. El Mzibri M, Benbacer L, Amrani M, Attaleb M, Khyatti M, Ennaji M, et al. Evaluation of P53, P16INK4a and E-Cadherin Status as Biomarkers for Cervical Cancer Diagnosis: INTECH Open Access Publisher; 2012.
۱۵. Ferenczy A, Wright TC. Anatomy and histology of the cervix. Blaustein's pathology of the female genital tract: Springer; 1994.
۱۶. امامي نائيني م. مراحل انجام پاپ اسمیر و نحوه تفسیر پاسخ ها. معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.
۱۷. F. F. Gynecology cancer epidemiology. iranain Journal of Obstetrics and Gynecology. 1392;8(1):47-52.
۱۸. Moore DH. Cervical cancer. Obstetrics & Gynecology. 2006;107(5):1152-61.
۱۹. Monsonogo J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. International Journal of cancer. 2004;108(3):329-33.
۲۰. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. Obstetrics & Gynecology. 2013;121(4):829-46.
۲۱. Hasan H. Cervical Cancer: Rosen; 2009.
۲۲. Chiu P-m, 趙佩文. Molecular genetics of cervical cancer: from chromosome number alterations to aberrant gene expressions. HKU Theses Online (HKUTO). 2009.
۲۳. Spencer JV. Cervical Cancer: Facts On File, Incorporated; 2009.
۲۴. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. New England Journal of Medicine. 1999;340(15):1144-53.
۲۵. F. M, M. A, E. KL, F. M, M. T, F. DHS. Medical Students' Knowledge, Attitude and Practice about Cervical Cancer Screening Method. iranain journal of surgery. 2015;23(1):45-54.
۲۶. Dijkstra M, Snijders P, Arbyn M, Rijkaart D, Berkhof J, Meijer C. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. Annals of Oncology. 2014:mdt538.
۲۷. Health WHOR, Research, Diseases WHOC, Promotion H. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice :World Health Organization; 2006.

۲۸. Fadare O. Precancerous Lesions of the Gynecologic Tract: Diagnostic and Molecular Genetic Pathology: Springer International Publishing; 2015.
۲۹. Giuntoli RL, Shockney L. Johns Hopkins Medicine Patients' Guide to Cervical Cancer: Jones & Bartlett Publishers; 2010.
۳۰. Sh. G. Clinical use of HPV DNA Testing. Iranian Journal of Obstetrics and Gynecology. 1391;7:82-8.
۳۱. Dutra I, Foroni I, Couto A, Lima M, Bruges-Armas J. Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus. HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND RELATED DISEASES: 2011.
۳۲. Sh. V. Clinical applications of HPV testing. Iranian Journal of Obstetrics and Gynecology. 1390;6(2):56-61.
۳۳. Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Human pathogenic papillomaviruses: Springer; 1994.
۳۴. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. Disease markers. 2007;23(4):315-30.
۳۵. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. BioMed research international, 2013.
۳۶. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein P16INK4a as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. BMC cancer. 2004;4(1):1.
۳۷. Lambert APF, Anschau F, Schmitt VM. P16INK4a expression in cervical premalignant and malignant lesions. Experimental and molecular pathology .2006;80(20):192-6.
۳۸. Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. Nature Reviews Cancer. 2003;3(3):217-26.
۳۹. Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. Journal of oncology. 2012
۴۰. M. S, Sh. S, M. Z, H. R, B. J. Sensitivity and Specificity of P16INK4a Immunohistochemistry in Diagnosis of Dysplastic Neoplastic Changes in Cervix. J Babol Univ Med Sci. 2009;11(1):8-13.
۴۱. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, et al. P16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. Pathology-Research and Practice. 2006;202(2):77-83.
۴۲. Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Georgescu CV, Niculescu M, Muntean M. The utility of p16, E-cadherin and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions diagnosis. Rom J Morphol Embryol. 2010;51(4):621-6.
۴۳. Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, et al. Immunohistochemical study of P16INK4a and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 2010;53(1):1.
۴۴. Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 2010;53(1):7.
۴۵. von Keyserling H, Kühn W, Schneider A, Bergmann T, Kaufmann AM. P16INK4a and p14ARF mRNA expression in Pap smears is age-related. Modern Pathology. 2012;25(3):465-70.
۴۶. Simanaviciene V, Popendikyte V, Gudleviciene Z, Armalyte S, Kirkutyte A, Shikova E, et al. Studies on the Expression of P16INK4a mRNA in Cervical Dysplasias. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2012;26(sup1):80-4.
۴۷. Gajanin Ž, Vilendečić R, Zlojutro VE, Gajanin R, Budakov P. Significance of Immunohistochemical Expression of P16INK4a in the Differentiation of Inflammatory and Preneoplastic Cervical Lesions. Srpski Arhiv Celok Lek. 2015;143(1):42-9.
۴۸. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and P16INK4a detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a

publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2008;17(10):2536-45.

٤٩. Wang J-L, Zheng B-Y, Li X-D, Ångström T, Lindström MS, Wallin K-L. Predictive significance of the alterations of P16INK4a, p14ARF, P53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(7):2407-14.

٥٠. Godoy A, Mandelli J, Oliveira F, Calegari S, Moura L, Serafini E. p16INK4a expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008;41(7):583-8.

٥١. Kanao H, Enomoto T, Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y, et al. Correlation between p14ARF/P16INK4a expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer letters*. 2004;213(1):31-7.

٥٢. Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K. Evaluation of pINK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay. *Cancer Cytopathology*. 2007;111(2):83-92.

٥٣. Holladay EB, Logan S, Arnold J, Knesel B, Smith GD. A comparison of the clinical utility of p16INK4a immunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/neoplasia. *Cancer Cytopathology*. 2006;108(6):451-61.

پیوست ها :

پیوست شماره ۱ :

روش تهیه بافر 10X TBE (Tris boric acid- EDTA)

مواد لازم:

۱	تریس
۲	بوریک اسید
۳	EDTA ۰/۵ مولار
۴	آب مقطر استریل

روش کار : ۵۴ گرم تریس و ۲۷/۵ گرم بوریک اسید را در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده و سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار را به آن اضافه کرده و با آب مقطر حجم محلول را به یک لیتر می رسانیم.

پیوست شماره ۲ :

روش تهیه بافر 1X TBE (Tris boric acid- EDTA)

روش کار : برای تهیه بافر 1X ، بافر 10X را به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق می کنیم.

پیوست شماره ۳ :

فهرست علائم اختصاری پر کاربرد (به ترتیب حروف الفبای انگلیسی)

AC: Adenocarcinoma

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

FFPE: Formalin fixed paraffin embedded (Tissue)

HPV: Human papilloma virus

H-R HPV: High risk human papilloma virus

HSIL: High (grade) squamous intraepithelial lesion

L-R HPV: Low risk human papilloma virus

LSIL: Low (grade) squamous intraepithelial lesion

SCC: squamous cell carcinoma

S.I.L: Squamous intraepithelial lesion

Abstract

Background: p16INK4a is a tumor suppressor protein that regulates the progression of eukaryotic cells cycle in abnormal conditions such as oncogenic stresses. Dedicated relation between this protein overexpression and cervical cancer progression led to using that as a biomarker in cervical cancer diagnosis.

Aim: Currently, most studies introduce P16INK4a as a novel and useful biomarker for cervical malignancies detection, but there are number of conflicting reports in different studies. Due to the fact that studies in Iran are limited and most of them are using qualitative approaches, this study investigated a quantitative approach for assessment of P16INK4a gene overexpression.

Method: P16INK4a quantitative gene expression of eighty-three formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cervical tissue from normal condition to cancer were studied. They are compared to (ACTB) housekeeping gene as reference with relative quantitative Real-Time PCR method.

Results: P16INK4a expression was found in 3/24 normal tissues (12.5 %), 8/24 tissues with koilocytic changes (33%), 6/13 of squamous intraepithelial lesions and 12/22 (55%) cancer tissues. P16ink4a Gene overexpression Compared to normal tissues was: 1.12 fold in koilocytic tissue, 3.42 fold in squamous intraepithelial lesions and 6.01 fold in cervical cancer tissue. Sensitivity, Specificity and accuracy was: 54.5%, 87.5%, 71.7% in cancerous cases, 46.2%, 87.5%, 72.9% in squamous intraepithelial lesions cases and 33.3%, 87.5%, 60% in cases with koilocytic changes.

Discussion and conclusion: P16INK4a gene expression, sensitivity and accuracy of test increased with disease progresses toward cancer and largest amount of increases in expression was observed in cervical cancer cases. Overexpression in P16INK4a protein can be considered as a confirmatory test for detecting patient's treatment and determining the disease proceeding in cases with a high degree of malignancy in the cervix.

Keywords: P16INK4a – Cervical Cancer – Gene expression – Real Time PCR



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

Medical microbiology and immunology department

Thesis submitted for

Master of Science degree in medical microbiology

Title:

**P16INK4a gene expression as molecular biomarker
In diagnosis of cervical precancer and cancer
In cervical biopsies With Real-Time PCR method
In Qazvin - Iran**

Supervisor Professor by:

Dr. M. Aslanimehr

Dr. T. Naserpour

Consultant Professor by:

Dr. H. Jahani Hashemi

Written by:

Siavash Bakhshian Sohi

Year of graduation: July 2016

Registration number: 79



به تلم خدا

صور تجلحه دفاع لڑ پلین نامه
فرم شماره (۳)

معاون پژوهشی دانشکده پزشکی:

با سلام،

بدینوسیله به استحضار می‌رساند بایان نامه دانشجویی/ تخصصی با عنوان Real-time PCR در تشخیص ویروس کرونا متعلق به خانم / آقای سپهر به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر غلامرضا در تاریخ ۹۵/۰۴/۲۳ دفاع گردید و با نمره ۱۹ معادل خوب مورد قبول هیئت داوران نامبرده در قیل قرار گرفت.

مهر و امضاء هیئت داوران:

مهر و امضاء استاد/ استادیار
راهنما:

مهر و امضاء استاد/ استادیار
مشاور:

مهر و امضاء استادی داور:

معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)

مدیر گروه

* یادآوری :

مطابق آیین نامه، جمله دفاعیه هنگامی اعتبار دارد که حداقل نصف بعلاوه یک اعضاء هیئت داوران در جلسه حضور داشته باشند (حضور استادیار راهنما و مشاور و معاون پژوهشی گروه/ ناظر در جلسه دفاع الزامی است).
نمره اعلام شده، معدل نمرات در جلسه دفاعیه است [استادیار راهنما، استادیار مشاور، داوران و معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)] که توسط معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر) جمع بنده و به دانشکده اعلام می‌شود.